

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR INNERE MEDIZIN III  
PROF. DR. WOLFGANG HERR  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG



## **Analyse des Einflusses unterschiedlicher bakterieller Stimuli auf humane dendritische Zellen**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Julia Charlotte Resch

2013

*meinen Eltern*

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR INNERE MEDIZIN III  
PROF. DR. WOLFGANG HERR  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG



## **Analyse des Einflusses unterschiedlicher bakterieller Stimuli auf humane dendritische Zellen**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Julia Charlotte Resch

2013

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Marina Kreutz
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Sigrid Karrer
Tag der mündlichen Prüfung:	12. Mai 2014

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Das Immunsystem .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>Die Rolle dendritischer Zellen im Immunsystem.....</b>	<b>1</b>
1.2.1	Charakterisierung von dendritischen Zellen.....	2
1.2.2	Detektion von Pathogenen durch dendritische Zellen.....	3
1.2.2.1	„Toll-like“-Rezeptoren.....	3
1.2.2.2	„NOD-like“-Rezeptoren.....	4
1.2.3	Induktion der Antigen-spezifischen T-Zellantwort durch dendritische Zellen.....	6
1.2.4	Immunsuppressive Mechanismen dendritischer Zellen .....	8
1.2.4.1	IDO und Tryptophanstoffwechsel dendritischer Zellen .....	8
1.2.4.2	Vitamin A-Stoffwechsel dendritischer Zellen.....	9
1.2.4.3	Vitamin D <sub>3</sub> -Stoffwechsel dendritischer Zellen .....	11
<b>1.3</b>	<b>GvHD als Komplikation der allogenen Stammzelltransplantation.....</b>	<b>13</b>
1.3.1	Stammzelltransplantation .....	13
1.3.2	Graft-versus-Host-Disease (GvHD) .....	14
1.3.2.1	Klinik der akuten GvHD.....	14
1.3.2.2	Pathophysiologie der akuten GvHD .....	14
1.3.3	Rolle von DCs in der akuten GvHD .....	16
1.3.3.1	Die Rolle von PRRs und ATG16L1 in der GvHD .....	16
1.3.3.2	Die Rolle von IDO in der GvHD .....	18
1.3.3.3	Die Rolle von Vitamin D <sub>3</sub> in der GvHD .....	18
<b>2</b>	<b>Zielsetzung .....</b>	<b>19</b>
<b>3</b>	<b>Material.....</b>	<b>20</b>
<b>3.1</b>	<b>Geräte .....</b>	<b>21</b>
<b>3.2</b>	<b>Verbrauchsmaterialien.....</b>	<b>21</b>
<b>3.3</b>	<b>Chemikalien, Reagenzien und Kits.....</b>	<b>21</b>
<b>3.4</b>	<b>Medien, Puffer und Lösungen.....</b>	<b>22</b>
<b>3.5</b>	<b>Antikörper .....</b>	<b>22</b>
<b>3.6</b>	<b>Oligonukleotide .....</b>	<b>23</b>
<b>3.7</b>	<b>Datenbanken und Software .....</b>	<b>24</b>

---

<b>4</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>25</b>
<b>4.1</b>	<b>Zellbiologische Methoden .....</b>	<b>25</b>
4.1.1	Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung .....	25
4.1.2	Gewinnung humaner Monozyten .....	25
4.1.3	Generierung von dendritischen Zellen aus primären Monozyten .....	26
4.1.4	Gewinnung dendritischer Zellen und deren Überstände .....	27
<b>4.2</b>	<b>Immunologische Methoden .....</b>	<b>27</b>
4.2.1	Gemischte Leukozytenreaktion (MLR) .....	27
4.2.2	Durchflusszytometrie .....	27
4.2.2.1	Oberflächenantigenfärbung .....	28
4.2.2.2	Intrazellulärfärbung .....	28
4.2.2.2.1	Färbung der Zytokine IL-2, IL-4, IFN- $\gamma$ und IL-17 .....	28
4.2.2.2.2	Färbung des Transkriptionsfaktors FoxP3 .....	29
4.2.3	Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) .....	29
<b>4.3</b>	<b>Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>29</b>
4.3.1	Isolation von RNA aus dendritischen Zellen .....	29
4.3.2	Agarose-Gelelektrophorese .....	30
4.3.3	Polymerasekettenreaktion .....	30
4.3.3.1	Reverse Transkription .....	31
4.3.3.2	„Real-time“ quantitative PCR (RT-qPCR) .....	31
4.3.3.2.1	Entwerfen von Primern für die RT-qPCR .....	31
4.3.3.2.2	Reaktionsansatz von RT-qPCR-Reaktionen .....	32
<b>4.4</b>	<b>Statistische Auswertung .....</b>	<b>33</b>
<b>5</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>34</b>
<b>5.1</b>	<b>Analyse der Expression von Oberflächenantigenen auf dendritischen Zellen nach Inkubation mit bakteriellen Komponenten .....</b>	<b>34</b>
5.1.1	Einfluss von LPS, Flagellin und MDP auf die Expression von Oberflächenantigenen auf dendritischen Zellen .....	34
5.1.2	Einfluss von LPS in Kombination mit Flagellin bzw. MDP auf die Expression von Oberflächenantigenen auf dendritischen Zellen .....	36
<b>5.2</b>	<b>Analyse der Zytokinproduktion dendritischer Zellen nach Inkubation mit bakteriellen Komponenten .....</b>	<b>38</b>
5.2.1	Zytokinsekretion dendritischer Zellen nach Stimulation mit LPS, Flagellin und MDP .....	39
5.2.2	Zytokinsekretion dendritischer Zellen nach Stimulation mit LPS in Kombination mit Flagellin bzw. MDP .....	40

---

<b>5.3 Analyse der Genexpression dendritischer Zellen nach Inkubation mit bakteriellen Komponenten .....</b>	<b>42</b>
5.3.1 Genexpression von Komponenten des angeborenen Immunsystems in dendritischen Zellen .....	42
5.3.1.1 Genexpression in dendritischen Zellen nach Inkubation mit LPS, Flagellin und MDP .....	42
5.3.1.2 Genexpression in dendritischen Zellen nach Inkubation mit LPS in Kombination mit Flagellin bzw. MDP .....	44
5.3.2 Genexpression von Komponenten des Tryptophanstoffwechsels in dendritischen Zellen .....	45
5.3.2.1 Genexpression in dendritischen Zellen nach Inkubation mit LPS, Flagellin und MDP .....	45
5.3.2.2 Genexpression in dendritischen Zellen nach Inkubation mit LPS in Kombination mit Flagellin bzw. MDP .....	46
5.3.3 Genexpression wichtiger Enzyme des Vitamin A- und Vitamin D <sub>3</sub> -Stoffwechsels in dendritischen Zellen .....	47
5.3.3.1 Genexpression in dendritischen Zellen nach Inkubation mit LPS, Flagellin und MDP .....	47
5.3.3.2 Genexpression in dendritischen Zellen nach Inkubation mit LPS in Kombination mit Flagellin bzw. MDP .....	49
<b>5.4 Analyse der Induktion der allogenen T-Zellantwort durch dendritische Zellen nach Inkubation mit bakteriellen Komponenten.....</b>	<b>50</b>
5.4.1 Analyse der allogenen T-Zellproliferation .....	50
5.4.1.1 Auswirkung der Stimulation dendritischer Zellen mit LPS, Flagellin und MDP auf die Proliferation allogener T-Zellen in An- und Abwesenheit von 25-Hydroxy-Vitamin D <sub>3</sub> .....	51
5.4.1.2 Auswirkung der Stimulation dendritischer Zellen mit LPS in Kombination mit Flagellin bzw. MDP auf die Proliferation allogener T-Zellen in An- und Abwesenheit von 25-Hydroxy-Vitamin D <sub>3</sub> .....	52
5.4.2 Analyse der Zytokinproduktion allogener T-Zellen.....	54
<b>6 Diskussion .....</b>	<b>57</b>
<b>6.1 Charakterisierung humaner dendritischer Zellen nach Inkubation mit bakteriellen Komponenten .....</b>	<b>57</b>
6.1.1 Oberflächenantigenexpression dendritischer Zellen .....	57
6.1.2 Zytokinsekretion dendritischer Zellen .....	59
6.1.3 Genexpression von bakteriellen Rezeptoren in dendritischen Zellen.....	63
6.1.4 Genexpression von Komponenten des Tryptophanstoffwechsels in dendritischen Zellen .....	65

6.1.5	Genexpression von Enzymen des Vitamin D <sub>3</sub> - und Vitamin A-Stoffwechsels in dendritischen Zellen .....	67
6.1.6	Einfluss von dendritischen Zellen auf die Induktion der allogenen T-Zellantwort ....	69
6.2	<b>Rolle von dendritischen Zellen in der Pathophysiologie der GvHD nach Inkubation mit bakteriellen Komponenten .....</b>	<b>75</b>
7	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>79</b>
8	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>81</b>
9	<b>Danksagung.....</b>	<b>118</b>
10	<b>Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>120</b>



## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1:	Humane „Toll-like“-Rezeptoren und ihre Liganden .....	4
Abbildung 1.2:	Aktivierung von NOD2 und NALP3 durch Peptidoglykan (PGN) .....	5
Abbildung 1.3:	Differenzierung von T-Lymphozyten .....	7
Abbildung 1.4:	Einfluss von Vitamin A-Metaboliten auf die Funktion von intestinalen dendritischen Zellen .....	10
Abbildung 1.5:	Einfluss von 1,25-Dihydroxy-Vitamin D <sub>3</sub> auf Immunzellen .....	12
Abbildung 1.6:	Pathophysiologie der akuten Graft-versus-Host-Disease (GvHD).....	15
Abbildung 5.1:	Oberflächenantigenexpression auf dendritischen Zellen unter Einfluss von LPS, Flagellin und MDP.....	35
Abbildung 5.2:	Durchflusszytometrische Darstellung der Oberflächenantigenexpression von CD1a und CD86 auf dendritischen Zellen unter Einfluss von LPS, Flagellin und MDP .....	36
Abbildung 5.3:	Oberflächenantigenexpression auf dendritischen Zellen unter Einfluss von LPS in Kombination mit Flagellin bzw. MDP .....	37
Abbildung 5.4:	Durchflusszytometrische Darstellung der Oberflächenantigenexpression von CD1a und CD86 auf dendritischen Zellen unter Einfluss von LPS in Kombination mit Flagellin bzw. MDP .....	38
Abbildung 5.5:	Zytokinsekretion dendritischer Zellen nach Stimulation mit LPS, Flagellin und MDP .....	39
Abbildung 5.6:	Zytokinsekretion dendritischer Zellen nach Stimulation mit LPS in Kombination mit Flagellin bzw. MDP .....	41
Abbildung 5.7:	Einfluss von LPS, Flagellin und MDP auf die mRNA-Expression von <i>TLR4</i> , <i>TLR5</i> und <i>NOD2</i> in dendritischen Zellen.....	42
Abbildung 5.8:	Einfluss von LPS, Flagellin und MDP auf die mRNA-Expression von <i>NALP3</i> und <i>ATG16L1</i> in dendritischen Zellen im Überblick.....	43
Abbildung 5.9:	Einfluss von LPS in Kombination mit Flagellin bzw. MDP auf die mRNA- Expression von <i>TLR4</i> , <i>TLR5</i> und <i>NOD2</i> in dendritischen Zellen.....	44
Abbildung 5.10:	Einfluss von LPS in Kombination mit Flagellin bzw. MDP auf die mRNA-Expression von <i>NALP3</i> und <i>ATG16L1</i> in dendritischen Zellen....	45
Abbildung 5.11:	Einfluss von LPS, Flagellin und MDP auf die mRNA-Expression von <i>IDO1</i> , <i>IDO2</i> und <i>AHR</i> in dendritischen Zellen.....	46
Abbildung 5.12:	Einfluss von LPS in Kombination mit Flagellin bzw. MDP auf die mRNA-Expression von <i>IDO1</i> , <i>IDO2</i> und <i>AHR</i> in dendritischen Zellen ....	47

---

Abbildung 5.13:	Einfluss von LPS, Flagellin und MDP auf die mRNA-Expression von <i>ALDH1A1</i> , <i>ALDH1A2</i> , <i>ALDH1A3</i> und <i>CYP27B1</i> in dendritischen Zellen .....	48
Abbildung 5.14:	Einfluss von LPS in Kombination mit Flagellin bzw. MDP auf die mRNA-Expression von <i>ALDH1A1</i> , <i>ALDH1A2</i> , <i>ALDH1A3</i> und <i>CYP27B1</i> in dendritischen Zellen .....	49
Abbildung 5.15:	Proliferation allogener T-Zellen nach Inkubation mit dendritischen Zellen unter Einfluss von LPS, Flagellin und MDP bei An- und Abwesenheit von 25-Hydroxy-Vitamin D <sub>3</sub> .....	51
Abbildung 5.16:	Auswirkung der Stimulation dendritischer Zellen mit LPS, Flagellin und MDP auf die Proliferation allogener T-Zellen bei An- und Abwesenheit von 25-Hydroxy-Vitamin D <sub>3</sub> im Überblick .....	52
Abbildung 5.17:	Proliferation allogener T-Zellen nach Inkubation mit dendritischen Zellen unter Einfluss von LPS in Kombination mit Flagellin bzw. MDP bei An- und Abwesenheit von 25-Hydroxy-Vitamin D <sub>3</sub> .....	53
Abbildung 5.18:	Auswirkung der Stimulation dendritischer Zellen mit LPS in Kombination mit Flagellin bzw. MDP auf die Proliferation von allophenen T-Zellen bei An- und Abwesenheit von 25-Hydroxy-Vitamin D <sub>3</sub> im Überblick .....	54
Abbildung 5.19:	Einfluss der Stimulation dendritischer Zellen mit LPS, Flagellin und MDP, sowie deren Kombinationen auf die Immunantwort allogener CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> T-Zellen auf Ebene des intrazellulären Zytokingehaltes und der FoxP3-Expression .....	56

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1:	Geräte.....	20
Tabelle 3.2:	Verbrauchsmaterialien .....	21
Tabelle 3.3:	Chemikalien, Reagenzien und Kits.....	21
Tabelle 3.4:	Medien, Puffer und Lösungen .....	22
Tabelle 3.5:	Antikörper.....	22
Tabelle 3.6:	Oligonukleotide .....	23
Tabelle 3.7:	Datenbanken und Software .....	24
Tabelle 4.1:	Elutriationsparameter und damit verbundene Zelltypen.....	26
Tabelle 4.2:	Zusammensetzung von RNA-Agarosegelen .....	30
Tabelle 4.3:	Standardprogramm für die RT-qPCR.....	32
Tabelle 6.1:	Übersicht über die Einflüsse von LPS, Flagellin und MDP sowie deren Kombinationen auf humane DCs im Vergleich zu iDCs .....	74

## Abkürzungsverzeichnis

1,25(OH) <sub>2</sub> VD <sub>3</sub>	1,25-Dihydroxy-Vitamin D <sub>3</sub>
25(OH)VD <sub>3</sub>	25-Hydroxy-Vitamin D <sub>3</sub>
<sup>3</sup> H	Tritium
AB-Serum	Serum von Blutspendern mit Blutgruppe AB
ADH	Alkoholdehydrogenase
AHR	Arylhydrocarbonrezeptor
AK	Antikörper
ALDH	Aldehyd-Dehydrogenase ( <i>aldehyde dehydrogenase</i> )
ARDS	Akutes Lungenversagen ( <i>acute respiratory distress syndrome</i> )
ATP	Adenosin-Triphosphat
ATRA	All-trans Retinsäure ( <i>all-trans retinoic acid</i> )
APC	Antigen-präsentierende Zelle ( <i>antigen-presenting cell</i> )
ASC	Apoptose-assoziiertes Speck-ähnliches CARD-enhaltenes Protein ( <i>apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD</i> )
ATG	Autophagie-ähnliches ( <i>autophagy-related</i> ) Protein
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BMDC	dem Knochenmark-abstammende dendritische Zelle ( <i>bone marrow-derived dendritic cell</i> )
Bp	Basenpaar
CARD	Caspase-Rekrutierungs-Domäne ( <i>caspase recruitment domain</i> )
CD	Differenzierungs-Cluster ( <i>cluster of differentiation</i> )
cDNA	komplementäre DNA ( <i>copy DNA</i> )
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankung
Ci	Curie
CLR	C-Typ-Lektin-ähnlicher ( <i>C-type-lectin-like</i> ) Rezeptor
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CpG	Cytosin-Phosphat-Guanin
Cpm	Impulse pro Minute ( <i>counts per minute</i> )
CTL	zytotoxische T-Zelle ( <i>cytotoxic T-lymphocyte</i> )
CTLA	zytotoxisches T-Lymphozyten Antigen ( <i>cytotoxic T-lymphocyte antigen</i> )
CYP27A1	Sterol-27-Hydroxylase
CYP27B1	25-Hydroxycholesterol-1- $\alpha$ -Hydroxylase
DBP	Vitamin D-bindendes Protein ( <i>Vitamin D-binding protein</i> )
DC	dendritische Zelle ( <i>dendritic cell</i> )
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	2'-Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphat

---

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzymgekoppelter Immunabsorptionstest ( <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> )
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung ( <i>fluorescence activated cell sorting</i> )
FCS	fetales Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Flag	Flagellin
FoxP3	Forkhead-Box-Protein 3
GALT	Darm-assoziiertes Lymphgewebe ( <i>gut-associated lymphoid tissue</i> )
GC	Guanin-Cytosin
GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor ( <i>granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor</i> )
GvHD	Transplantat-gegen-Wirt-Erkrankung ( <i>Graft-versus-Host-Disease</i> )
GvL-Effekt	Transplantat-gegen-Leukämie-Effekt ( <i>Graft-versus-leukemia</i> )
H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub>	zweifach destilliertes, mit DEPC-versetztes Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>USB</sub>	DEPC-behandeltes USB-Wasser
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie ( <i>high performance liquid chromatography</i> )
iDC	unreife dendritische Zelle ( <i>immature dendritic cell</i> )
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IEC	intestinale Epithelzelle ( <i>intestinal epithelial cell</i> )
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IRF	Interferon-regulatorischer Faktor ( <i>interferon-regulatory-factor</i> )
iTreg	induzierbare regulatorische T-Zelle
LAT	L-Aminosäure-Transporter ( <i>L amino acid transporter</i> )
LBP	Lipopolysaccharid-bindendes Protein
LP-DC	Lamina propria-dendritische Zelle ( <i>lamina propria-dendritic cell</i> )
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	Leucin-reiche Region ( <i>leucin-rich region</i> )
Lsg.	Lösung
mDC	reife dendritische Zelle ( <i>mature dendritic cell</i> )
MD	myeloides Differenzierungsprotein
MDP	Muramyl-dipeptid
mHA	Minorhistokompatibilitätsantigen ( <i>minor histocompatibility complex</i> )
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex ( <i>major histocompatibility complex</i> )
MLN	mesenterialer Lymphknoten ( <i>mesenterial lymph node</i> )

---

MLR	gemischte Lymphozytenreaktion ( <i>mixed lymphocyte reaction</i> )
MNC	mononukleäre Zelle ( <i>mononuclear cell</i> )
moDC	von Monozyten-abstammende dendritische Zelle ( <i>monocyte-derived dendritic cell</i> )
MODS	Multiorganversagen ( <i>multiple organ dysfunction syndrome</i> )
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mRNA	„messenger“ RNA
NALP	NACHT-, Leucin-reiche-Region-, und Pyrin-Domäne-enthaltendes Protein ( <i>NACHT-, leucin-rich-region-, pyrin-domain-containing protein</i> )
NaOH	Natriumhydroxid
NF- $\kappa$ B	nukleärer Faktor $\kappa$ B
NK-Zelle	Natürliche Killer-Zelle
NLR	NOD-ähnlicher ( <i>NOD-like</i> ) Rezeptor
NOD	Nukleotid-bindendes Oligomerisierungsdomäne-enthaltendes Protein ( <i>nucleotide-binding oligomerisation domain-containing protein</i> )
nTreg	natürliche regulatorische T-Zelle
PAMP	Pathogen-assoziiertes molekulares Muster ( <i>pathogen-associated molecular pattern</i> )
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
pDC	plasmazytoide dendritische Zelle ( <i>plasmacytoide dendritic cell</i> )
PD-L	Programmierter Zelltod-Ligand ( <i>programmed cell death ligand</i> )
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PGN	Peptidoglykan
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PP	Peyer-Plaques
PRR	Mustererkennungsrezeptor ( <i>pattern recognition receptor</i> )
PYD	Pyrin-Domäne
RA	Retinsäure ( <i>retinoic acid</i> )
RAR	All-trans-Retinsäure-Rezeptor
RARE	Retinsäure-assoziierte Elemente ( <i>retinoic acid response elements</i> )
RBP	Retinol-bindendes Protein
RLR	RIG-ähnlicher ( <i>RIG-like</i> ) Rezeptor
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (Entwicklungsort des Kulturmediums)
RT	reverse Transkription
RT-qPCR	quantitative Polymerasekettenreaktion in Echtzeit ( <i>real-time quantitative polymerase chain reaction</i> )

RXR	9-cis-Retinsäure-Rezeptor
s	Sekunde
SD	Standardabweichung ( <i>standard deviation</i> )
SNP	Einzelner Nukleotidpolymorphismus ( <i>single nucleotide polymorphism</i> )
$\beta_2$ M	$\beta_2$ -Mikroglobulin
SZT	Stammzelltransplantation
TDC	tolerogene dendritische Zelle ( <i>tolerogenic dendritic cell</i> )
T <sub>H</sub> -Zellen	T-Helferzellen
TIR-Domäne	Toll-Interleukin-1-Rezeptor-Domäne
TLR	Toll-ähnlicher ( <i>toll-like</i> ) Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg	regulatorische T-Zelle
TRM	Transplantations-assoziierte Mortalität ( <i>transplant related mortality</i> )
Upm	Umdrehungen pro Minute
VAD	Vitamin A-defizient
VD <sub>3</sub>	Vitamin D <sub>3</sub>
VDR	Vitamin-D-Rezeptor
VDRE	Vitamin D <sub>3</sub> -empfindliche Elemente ( <i>Vitamin D<sub>3</sub> response elements</i> )
VOD	Venenverschlusskrankheit ( <i>veno-occlusive disease</i> )
1,25(OH) <sub>2</sub> VD <sub>3</sub>	1,25-Dihydroxy-Vitamin D <sub>3</sub>
25(OH)VD <sub>3</sub>	25-Hydroxy-Vitamin D <sub>3</sub>

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Immunsystem

Unser Organismus wird täglich mit einer Vielzahl von potentiell infektiösen Mikroorganismen wie Viren, Bakterien, Pilzen und Parasiten konfrontiert. Das Immunsystem ermöglicht hierbei durch die Erkennung und die spezifische Abwehr der eindringenden Pathogene einen gezielten Schutz vor der Ausbreitung und der Manifestation von Infektionen in unserem Körper. Dabei ist es von essentieller Bedeutung, dass das Immunsystem in der Lage ist, zwischen körpereigenen und körperfremden Strukturen zu unterscheiden. Um eine optimal abgestimmte Abwehrreaktion des Körpers zu gewährleisten, besteht das Immunsystem aus zwei miteinander kooperierenden Systemen: dem sofort verfügbaren angeborenen (unspezifischen) und dem verzögert einsetzenden adaptiven (spezifischen) Immunsystem.

Das angeborene Immunsystem ist für die unspezifische, sehr schnelle Abwehrreaktion des Körpers gegen ein Pathogen verantwortlich und stellt den phylogenetisch ältesten Teil der Immunabwehr dar. Zum Schutz vor dem Eindringen eines Erregers und dessen Elimination existieren sowohl epitheliale Barrieren, wie Haut oder Schleimhäute, als auch humorale Abwehrmechanismen, wie die Aktivierung des Komplementsystems, sowie die Produktion von Akut-Phase-Proteinen und Zytokinen, die von zellulären Effektoren des angeborenen Immunsystems sezerniert werden. Zu den zellulären Effektoren werden Makrophagen, Granulozyten, Mastzellen, Natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen) und dendritische Zellen (DC, *dendritic cell*) gezählt. Das adaptive Immunsystem besteht aus B- und T-Lymphozyten, die in der Lage sind, durch die Produktion von Antigen-spezifischen Antikörpern (AK) durch aktivierte B-Zellen und einer T-Zell-vermittelten Abwehrreaktion, eine hoch spezifische Immunantwort zu generieren und den Krankheitserreger, der dem angeborenen Immunsystem entkommen ist, zu eliminieren. Die Aktivierung und die Induktion einer klonalen Proliferation der Lymphozyten erfolgt über die Erkennung der Pathogene durch hoch spezifische membranständige AK auf B-Zellen sowie über Antigen-spezifische Rezeptoren auf T-Zellen (TCR, *T-cell-receptor*), die während der Entwicklungsphase durch somatische Rekombination des Erbmaterials entstehen und somit keinem genetischem Vererbungsmuster unterliegen. Sie weisen daher eine hohe Spezifität und Diversität auf, die eine Detektion einer Vielzahl von Pathogenen möglich macht [1-3].

## 1.2 Die Rolle dendritischer Zellen im Immunsystem

Dendritische Zellen gehören, neben Makrophagen, Monozyten und B-Lymphozyten, zu den professionellen Antigen-präsentierenden Zellen (APC, *antigen-presenting cell*), die den Schnittpunkt der zwei kooperierenden Immunsysteme bilden. Die APCs steuern und modulieren das Ausmaß und den Beginn der adaptiven Immunantwort, indem sie detektierte und prozessierte Pathogene den Zellen des adaptiven Immunsystems in sekundären Lymphorganen präsentieren und diese somit zur Proliferation und Differenzierung anregen [1, 2, 4].



### 1.2.1 Charakterisierung von dendritischen Zellen

Dendritische Zellen sind in zahlreichen Oberflächengeweben und Schleimhäuten des Körpers wie der Haut, dem Respirations- und Gastrointestinaltrakts, sowie den weiblichen Genitalorganen lokalisiert. Sie zeichnen sich durch eine sternförmige Gestalt mit mobilen Zytoplasmafortsätzen (Dendriten) aus, die ihnen eine optimale Detektion von Pathogenen ermöglichen [5-7]. Im menschlichen Körper differenzieren unreife DCs (iDC, *immature DC*) aus Monozyten. Sie unterscheiden sich von ihren Vorgängern durch die Herabregulation des für Monozyten typischen Oberflächenantigens CD (*cluster of differentiation*) 14 und die verstärkte Expression von CD1a [8]. Spezifische Strukturen der eingedrungenen Erreger, wie z.B. Lipopolysaccharid (LPS), Flagellin, sowie unmethylierte CpG (Cytosin-Phosphat-Guanin)-DNA [8-10], werden von den iDCs über verschiedene Mustererkennungsrezeptoren (PRR, *pattern recognition receptor*) erkannt. Dies stimuliert die iDCs dazu, Pathogene über Pino- und Phagozytose aufzunehmen, diese in Lysosomen zu zerstören und zu prozessieren, um sie über Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC, *major histocompatibility complex*) -II- Molekülen auf ihrer Zelloberfläche präsentieren zu können. Dieser Prozess induziert die Reifung von unreifen zu reifen DCs (mDC, *mature DC*) [4, 11-13]. Allerdings induziert nicht nur die Exposition und Erkennung von mikrobiellen Komponenten die Reifung von DCs, sondern es führt auch die Inkubation von iDCs mit proinflammatorischen Zytokinen wie Tumornekrosefaktor (TNF), Interleukin (IL)-1 $\beta$  und IL-6 [14] sowie die Interaktion von iDCs mit aktivierten T-Zellen über CD40L (CD154) [15] zur einer effizienten DC-Reifung.

Im Zuge der Aktivierung der DCs verlieren diese ihre Fähigkeit der Antigenaufnahme, sind dann aber in der Lage das Antigen verstärkt zu präsentieren, welches sie im „Entzündungsherd“ aufgenommen haben [16]. Die DC-Reifung zeichnet sich durch die Hochregulation kostimulatorischer Moleküle wie CD80, CD86 und CD40, des DC-Reifungsmarkers CD83 sowie der verstärkten Expression peptidbeladener MHC-II-Moleküle und bestimmter Chemokinrezeptoren aus. Dies reguliert die Migration der DCs in die sekundären Lymphorgane wie die Lymphknoten und gewährleistet eine effiziente Antigenpräsentation gegenüber den dort lokalisierten naiven T-Zellen [5, 8, 17, 18]. Durch die Sekretion verschiedener proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 $\beta$ , TNF, IL-8 sowie IL-12 durch reife DCs wird sowohl die Generierung einer adaptiven Immunantwort eingeleitet und naive T-Lymphozyten zur klonalen Expansion und Differenzierung angeregt [5, 19], als auch neutrophile Granulozyten rekrutiert und Gefäßendothelien aktiviert. Dies hat eine erhöhte Gefäßpermeabilität, ein Einwandern von Immunzellen in das Gewebe und eine z.T. lokale Gewebszerstörung zur Folge [1, 2, 5].

Unter dem Einfluss von immunsuppressiven Molekülen, wie IL-10 und TGF (*transforming-growth factor*)- $\beta$ , entwickeln sich jedoch aus unreifen DCs sogenannte tolerogene DCs (TDC, *tolerogenic DC*), die durch die Sekretion von antiinflammatorischen Zytokinen an der Generierung der peripheren Toleranz beteiligt sind und der proinflammatorischen Immunantwort entgegenwirken [20-23]. Da die Gewinnung von DCs aus humanem Blut nur bedingt möglich ist, werden iDCs *in vitro* durch die Stimulation mit IL-4 und GM-CSF (*granulocyte/macrophage colony-stimulating factor*) aus humanen Monozyten gewonnen [24].

## 1.2.2 Detektion von Pathogenen durch dendritische Zellen

DCs erkennen eingedrungene Pathogene anhand von spezifischen Strukturen, den sogenannten PAMPs (*pathogen associated molecular pattern*), die für die Pathogenität und das Überleben eines Erregers essentiell sind. Diese werden über die sogenannten PRRs detektiert, welche in der Keimbahn kodiert sind, wodurch ihre Spezifität genetisch festgelegt ist. Sie sind sowohl intra- als auch extrazellulär lokalisiert, um eine optimale Detektion einer Vielzahl von pathogenen Strukturen zu gewährleisten und werden unter anderem auf APCs exprimiert. Als einige wichtige Vertreter der PRRs sind „Toll-like“-Rezeptoren (TLRs), „NOD-like“-Rezeptoren (NLRs), „RIG-like“-Rezeptoren (RLRs) und „C-type-lectin-like“-Rezeptoren (CLRs) zu nennen [4, 11, 25].

### 1.2.2.1 „Toll-like“-Rezeptoren

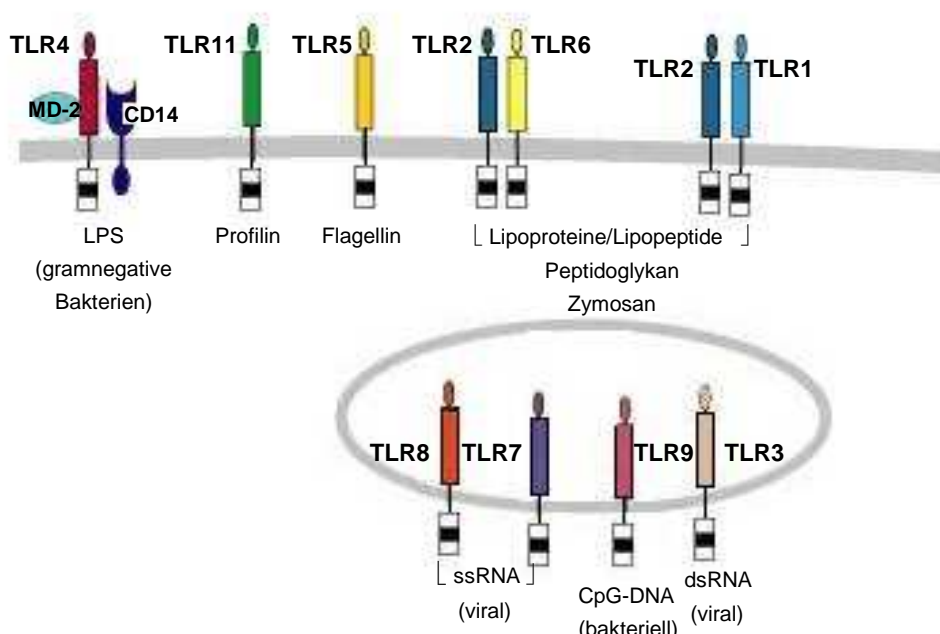
Es existieren insgesamt elf verschiedene humane TLRs, die sowohl intrazellulär in Endo- oder Lysosomen (TLR 3, 7, 8, 9), als auch auf der Zelloberfläche (TLR 1, 2, 4, 5, 6, 10, 11) lokalisiert sind und die Erkennung unterschiedlichster PAMPs ermöglichen. Sie werden sowohl auf hämatopoetischen Zellen, wie DCs, T- und B-Zellen, Makrophagen und NK-Zellen, als auch auf nicht-hämatopoetischen Zellen wie dem Endothel, dem Epithel, dem Organparenchym und auf Fibroblasten exprimiert [25].

TLRs bestehen als Typ 1 Transmembranproteinen aus einer Leucin-reichen Region (LRR, *leucin-rich region*), die den Liganden bindet, einer zentralen Transmembrandomäne und einer zytoplasmatischen „Toll-Interleukin-1-Rezeptor“ (TIR)- Domäne [26]. Nach Interaktion der Leucin-reichen Region mit einem Liganden erfolgt, je nach Art des TLRs, die Zusammenlagerung der TLRs zu Homo- oder Heterodimeren. Über die Rekrutierung von intrazellulären Adaptorproteinen resultiert die Aktivierung verschiedener Signalwege, wie der NF $\kappa$ B (nukleärer Faktor  $\kappa$ B)-Signalkaskade, die zur Induktion von Effektorfunktionen der Zelle führt [25]. Hauptfunktion der Signalübermittlung über TLRs liegt in der Induktion der Phagozytose, der Antigenpräsentation, der Zytokinproduktion und der DC-Reifung [27, 28]. Zu den von TLRs erkannten Strukturen gehören beispielweise Lipoproteine und Lipoteichonsäuren, Zymosan, virale oder bakterielle DNA oder RNA, unmethylierte CpG-DNA, sowie auch Flagellin oder LPS (siehe Abbildung 1.1) [25].

LPS ist Hauptbestandteil gramnegativer Bakterien und besteht aus einer O-spezifischen Polysaccharidkette, einem Core-Anteil und dem bei Zerfall des Bakteriums als Endotoxin wirkender Lipid-A-Anteil. Es wird durch den „Toll-like“-Rezeptor 4 (TLR4) vom Immunsystem erkannt [29, 30]. Im Blutserum wird LPS an das LPS-bindende Protein (LBP) gebunden, welches als Lipidtransferase LPS auf das zellgebundene CD14 überträgt. CD14 bindet dabei an das myeloide Differenzierungsprotein-2 (MD2), welches mit der extrazellulären Domäne von TLR4 in Verbindung steht, wodurch ein LPS-MD-2-TLR4-Komplex entsteht [31, 32].

Flagellin wird als Bestandteil der Bakteriengeißel von TLR5 detektiert und bindet im Gegensatz zu LPS direkt an seinen Rezeptor [33]. Über die Transmembrandomäne vermittelt, führt die Bindung der PAMPs an ihren jeweiligen Rezeptor zur Induktion der TLR-Signalkaskade. Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B bewirkt hierbei die Transkription von Genen

sowohl proinflammatorischer Zytokine wie TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 und IL-12 als auch antiinflammatorischer Zytokine wie z. B. IL-10 [17, 25, 34-36].



**Abbildung 1.1: Humane „Toll-like“-Rezeptoren und ihre Liganden**

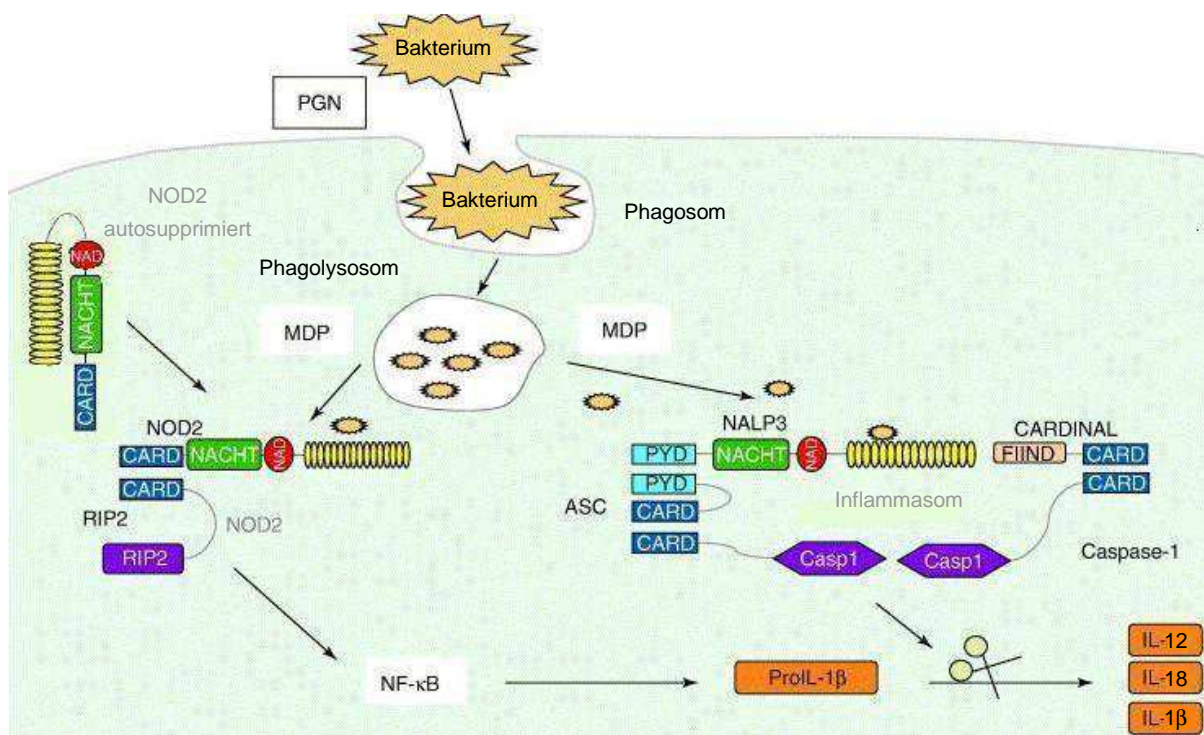
Es existieren 11 humane „Toll-like“-Rezeptoren (TLRs), die sowohl extrazellulär in der Plasmamembran verankert als auch intrazellulär lokalisiert sind. Sie dienen der Erkennung einer Vielzahl bakterieller, viraler und parasitärer Komponenten. Weitere Abkürzungen: LPS: Lipopolysaccharid, ss: einzelsträngig (*single*), ds: doppelsträngig, CpG: Cytosin-Phosphat-Guanin, DNA: Desoxyribonukleinsäure, RNA: Ribonukleinsäure, MD: myeloides Differenzierungsprotein. Abbildung nach [25, 37], modifiziert.

### 1.2.2.2 „NOD-like“-Rezeptoren

Aufgrund ihrer intrazellulären Lokalisation detektieren NLRs intrazelluläre Pathogene. NLRs werden durch ihre NACHT-Domäne charakterisiert. Den Rezeptoren ist der dreigliedrige Aufbau aus einer Leucin-reichen-Region, die Antigene bindet, einer NACHT-Domäne, durch dessen Oligomerisierung es zur Aktivierung des Rezeptors kommt und eine N-terminale Effektordomäne gemeinsam. Durch die Interaktion der Effektordomänen mit Caspasen, Kinasen oder Adaptorproteinen erfolgt die Aktivierung von NF $\kappa$ B und somit die Transkription proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 $\beta$ , IL-12, IL-18 und TNF (siehe Abbildung 1.2) [38-41]. Als wichtige Vertreter der NLR-Familie sind NALP3 (*NACHT*-, *LRR*-, and *pyrin domain (PYD)-containing protein 3*) und NOD2 (*nucleotide-binding oligomerisation domain-containing protein 2*) zu nennen. Beide Rezeptoren detektieren Muramylpeptid (MDP), ein Bestandteil von Peptidoglykan (PGN), welches in der Zellwand von sowohl gramnegativen als auch grampositiven Bakterien enthalten ist [42, 43].

NALP3 ist Bestandteil des Inflammasoms, welches als Abwehrmechanismus unseres unspezifischen Immunsystems gegen mikrobielle Pathogene dient. Die Aktivierung des Inflammasoms erfolgt über die Interaktion von NALP3, CARDINAL, ASC (*apoptosis-associated*

*speck-like protein containing a CARD*) und Caspase-1, was die Reifung von IL-1 $\beta$  und IL-18 induziert (siehe Abbildung 1.2) [44].



**Abbildung 1.2: Aktivierung von NOD2 und NALP3 durch Peptidoglykan (PGN)**

Nach Phagozytose eines Bakteriums wird das in der Zellwand enthaltene PGN im Phagolysosom zu MDP degradiert. Die Freisetzung von MDP in das Zytoplasma induziert die Aktivierung von NOD2 und NALP3. Die Formation des NOD2-Rip2-Komplexes führt zur Aktivierung von NF $\kappa$ B und der Synthese von ProIL-1 $\beta$ . Die Aktivierung von NALP3 hat die Formation des Inflammasomkomplexes (NALP3, CARDINAL, ASC und Caspase-1 (*Casp1*)) zur Folge. Die Bildung von IL-1 $\beta$ , IL-18 und IL-12 bildet die gemeinsame Endstrecke der Aktivierung von NOD2 und NALP3. Weitere Abkürzungen: CARD: *caspase recruitment domain*, PYD: *pyrin domain*, FIIND: *function to find*, NAD: *NACHT-associated domain*, ASC: *apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*. Abbildung nach [41], modifiziert.

NOD2/CARD15 wird in Monozyten, Makrophagen, Granulozyten und DCs, sowie in hohem Maße in den Paneth-Zellen exprimiert [39, 45, 46]. Wie von Cooney *et al.* und Brain *et al.* beschrieben, ist NOD2 nicht nur allein für die Detektion von MDP verantwortlich, sondern induziert auch über MDP durch die Rekrutierung von ATG5, ATG7 und ATG16L1 (ATG, *autophagy-related protein*) die Autophagozytose in DCs [47, 48]. Die ATG-Proteine sind am Aufbau des Autophagosoms beteiligt, welches zum Abbau beschädigter Zellorganellen sowie intrazellulärer Bakterien dient, die während einer Infektion eliminiert werden sollen [3, 49, 50]. Des Weiteren fusionieren Autophagosomen mit MHC-II-beladenen Kompartimenten, wodurch Komponenten von phagozytierten Bakterien der Antigenpräsentation zugeführt werden [51, 52].

### 1.2.3 Induktion der Antigen-spezifischen T-Zellantwort durch dendritische Zellen

T-Lymphozyten werden anhand der Expression ihrer charakteristischen CD-Moleküle in  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen eingeteilt, wobei beide den typischen T-Zellmarker CD3 tragen, der für die Funktion des TCR essentiell ist [53].  $CD8^+$  T-Zellen (CTL, *cytotoxic T-lymphocyte*) werden durch die Präsentation von intrazellulären Antigenen über MHC-I-Moleküle aktiviert, die auf allen kernhaltigen Zellen zu finden sind. Demgegenüber erfolgt die Aktivierung der  $CD4^+$  T-Lymphozyten, sogenannte T-Helfer-Zellen ( $T_H$ ), durch die Interaktion der  $T_H$ -Zelle mit der DC über den TCR und dem beladenen MHC-II-Molekül, welches das T-Zell-spezifische Antigen enthält. Zur vollständigen Aktivierung der  $CD4^+$  T-Zellen ist die Expression kostimulatorischer Moleküle wie CD80, CD86 und CD40 auf DCs sowie CD28 und CD40L auf T-Zellen notwendig, welche ebenfalls miteinander in Interaktion treten [1, 2, 4].

Zur Aufrechterhaltung der Immunhomöostase exprimieren DCs neben kostimulatorischen auch koinhibitorische Moleküle, wie PD-L1 (*programmed-cell-death-ligand 1*, auch CD274), welcher PD-1 (*programmed death-1*) auf aktivierten  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen bindet. Dies führt zur Inhibition der DC-Reifung sowie der proinflammatorischen T-Zellantwort [54-57]. Zudem ist PD-L1 auf Makrophagen, B-Zellen sowie Tumorzellen exprimiert und wird durch IL-10 induziert [58]. Des Weiteren exprimieren DCs CD95 (Fas) [59-61]. Das Fas-FasL (CD95L)-System dient zur Induktion der Apoptose in der Zielzelle. Hierbei spielt es eine wichtige Rolle im Rahmen der Aufrechterhaltung der B- und T-Zellhomöostase und der Selbsttoleranz zur Prävention von Autoimmunerkrankungen [62-65].

Neben dem präsentierten Antigen beeinflusst auch das sezernierte Zytokinprofil der DCs die T-Zellantwort und die Art der induzierten T-Zellsubpopulationen [18, 19].

Die wichtigsten Subpopulationen der  $CD4^+$  T-Zellen stellen derzeit  $T_H1$ -,  $T_H2$ -,  $T_H17$ -Zellen und regulatorische T-Zellen (Tregs) dar (siehe Abbildung 1.3) [1, 2].

#### $T_H1$ - Lymphozyten:

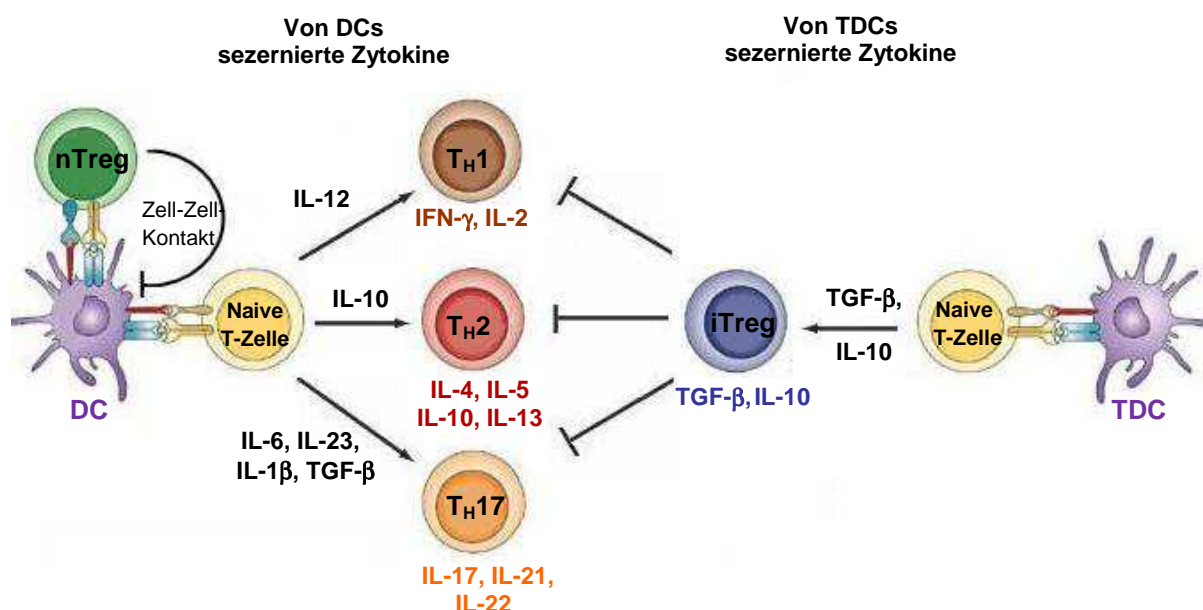
IL-12, welches von den DCs während der inflammatorischen Immunantwort sezerniert wird, induziert die Generierung von  $T_H1$ -Lymphozyten. Diese zeichnen sich durch die Freisetzung von Interferon (IFN)  $\gamma$  und IL-2 aus, wobei IL-2 wiederum die Proliferation der T-Zellen stimuliert. IFN- $\gamma$  steigert die Phagozytose-Kapazität von Makrophagen, was die effiziente Abtötung der Erreger zur Folge hat. Zudem supprimiert IFN- $\gamma$  die  $T_H2$ -Antwort [3, 53, 66-68].

#### $T_H2$ - Lymphozyten:

Die Differenzierung zu  $T_H2$ - Zellen erfolgt durch die Anwesenheit von IL-10, welches von den DCs sezerniert wird [69, 70].  $T_H2$ - Zellen üben ihre Funktionen über die Sekretion der Zytokine IL-4, IL-5, IL-10, TGF- $\beta$  und IL-13 aus. Die Interaktion der  $T_H2$ -Zellen mit B-Lymphozyten führt zur Differenzierung von Plasmazellen, die durch die Freisetzung von löslichen Antikörpern wie IgA, IgE und IgG charakterisiert sind. Dies dient der Parasitenabwehr und ist für Induktion von Allergien verantwortlich. Das antiinflammatorische Zytokin IL-10 [71] hemmt zusammen mit TGF- $\beta$  die  $T_H1$ -Antwort [3, 53, 67, 68].

### $T_H17$ -Lymphozyten:

Die Anwesenheit von TGF- $\beta$ , IL-6, IL-23 sowie IL-1 $\beta$  induziert die Entwicklung von  $T_H17$ -Zellen [72-76]. Dies geschieht allerdings nur in Abwesenheit von  $T_H1$ - oder  $T_H2$ -polarisierenden Zytokinen [67]. IL-6 bewirkt durch die Inhibition der Entwicklung von Tregs die  $T_H17$ -Generierung [75], wobei IL-23 einen wichtigen Stabilisator für die Funktion der  $T_H17$ -Lymphozyten darstellt [68, 76]. Durch die Induktion der Effektormoleküle IL-21, IL-22 und IL-17 üben die  $T_H17$ -Zellen über die Rekrutierung und Aktivierung von neutrophilen Granulozyten eine wichtige Rolle in der frühen Entzündungsphase aus. Zudem sind sie an der Abwehr extrazellulärer Pathogene, der Pilzabwehr und dem Erhalt der Homöostase im Darm beteiligt [53, 67, 68, 77].



**Abbildung 1.3: Differenzierung von T-Lymphozyten**

Naive  $CD4^+$  T-Zellen können sich nach Kontakt mit immunogenen DCs je nach vorherrschendem Zytokinmilieu in  $T_H1$ -,  $T_H2$ - oder  $T_H17$ -Zellen differenzieren. Diese zeichnen sich wiederum durch die Sekretion unterschiedlicher Zytokine aus, die ihre Funktionen bestimmen. Regulatorische T-Zellen lassen sich in natürliche  $CD4^+CD25^+$  FoxP3 $^+$  (*forkhead-box-Protein 3*) regulatorische T-Zellen (nTreg) und induzierbare Tregs (iTregs) einteilen und entstehen aus naiven T-Zellen nach Kontakt mit tolerogenen DCs (TDC, *tolerogenic DC*). Die Hauptfunktion der Tregs liegt in der Suppression von  $T_H$ -Zellen. nTregs üben hierbei ihre immunsuppressive Wirkung über Zell-Zell-Kontakt mit DCs aus, wohingegen iTregs durch die Sekretion von IL-10 und TGF- $\beta$  inhibitorisch wirken. Abbildung nach [68, 78], modifiziert.

### Regulatorische T-Lymphozyten

TDCs sind durch die Sekretion antiinflammatorischer Zytokine wie IL-10 und TGF- $\beta$  und der Expression von koinhibitorischen Molekülen auf ihrer Oberfläche in der Lage, naive T-Zellen zur Differenzierung zu sogenannten peripher induzierbaren regulatorischen T-Zellen (iTreg) anzuregen. Diese üben ihre immunsuppressive Wirkung unter anderem über die Freisetzung von IL-10 und TGF- $\beta$  aus [20-23, 78, 79]. Darüber hinaus existieren die natürlich vorkommenden, vom Thymus abstammenden  $CD4^+CD25^+$ FoxP3 $^+$  (*forkhead-box-Protein 3*) Tregs (nTregs, natürliche Tregs), die 10-15% der  $CD4^+$  T-Zellen ausmachen [80]. Der Transkripti-

onsfaktor FoxP3 ist ein essentieller molekularer Marker, der die Transkription des IL-2-Genes verhindert und somit IL-2 den aktivierten T<sub>H</sub>-Zellen als Proliferationsstimulus entzieht [81, 82]. Trotz Unterdrückung der IL-2-Produktion ist das Zytokin IL-2 allerdings essentiell für den Erhalt der Funktion und zum Überleben der Tregs [83-86]. nTregs üben ihre Wirkung über einen zellkontaktabhängigen Weg aus und werden durch ihre hochaffine Bindung an MHC-Moleküle, die mit körpereigenen Peptiden beladen sind, im Thymus selektiert [53, 79]. Tregs kontrollieren die T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2- vermittelte Immunität, schützen vor Autoimmunität und chronischen Immunantworten, verhindern eine Transplantatabstoßung und induzieren eine Immuntoleranz [18, 77, 87, 88].

## 1.2.4 Immunsuppressive Mechanismen dendritischer Zellen

Durch die Expression immunmodulatorischer Enzyme, wie z.B. die Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) und die Produktion von immunregulatorischen Vitaminen wie Vitamin A und D<sub>3</sub>, nehmen DCs einen Einfluss auf die Aufrechterhaltung der Immunhomöostase und der Toleranzentwicklung im Immunsystem.

### 1.2.4.1 IDO und Tryptophanstoffwechsel dendritischer Zellen

Die essentielle Aminosäure Tryptophan dient der Proteinbiosynthese sowie der Gewinnung von Reduktionsäquivalenten wie den Nikotinamidnukleotiden NAD<sup>+</sup> und NADP<sup>+</sup>, die beim Abbau von Tryptophan entstehen [3, 89]. Zudem spielt Tryptophan eine wichtige Rolle in der Immunregulation, da aktivierte Effektor-T-Zellen die Aminosäure für ihre Proliferation benötigen und die proinflammatorische Aktivität der T-Zellen bei geringen Tryptophanspiegeln inhibiert wird [53, 90, 91]. Die intrazellulär lokalisierten IDO1 und IDO2 stellen zwei Schlüsselenzyme des Tryptophanmetabolismus dar, da sie den ersten Schritt des Tryptophanabbaus zu Kynurenin katalysieren [91-93]. IDO wird in Anwesenheit proinflammatorischer Reize wie LPS, unmethylierter CpG-DNA, IFN- $\gamma$  und durch Bindung kostimulatorischer Moleküle auf DCs und Makrophagen hochreguliert [94-98]. Durch die verstärkte Expression von IDO wird der extrazelluläre Tryptophangehalt vermindert und somit die essentielle Aminosäure den aktivierten T-Lymphozyten entzogen [99]. Tryptophan gelangt hierbei über den sogenannten LAT (*L-amino-acid-transporter*) in die Zelle [100-102]. Des Weiteren induziert der beim Abbau entstandene Metabolit Kynurenin zum einen die Apoptose von Effektor-T-Zellen, insbesondere von T<sub>H</sub>1-Zellen [90, 103, 104]. Zum anderen wird Kynurenin im Zytosol an den Transkriptionsfaktor Arylhydrocarbonrezeptor (AHR) gebunden [105-107], der nach Bindung des Liganden aktiviert wird und die Generierung von Tregs induziert [108-110]. Zudem erfolgt auch die Hochregulation von IDO in Abhängigkeit der Aktivierung von AHR [110-112]. Gerade die Kombination aus Kynurenin und einem verminderten extrazellulären Tryptophanlevel zeigen synergistische immunsuppressive Effekte [113, 114]. Demzufolge hat IDO eine essentielle Bedeutung im Rahmen der Immunregulation, was sich an der Beteiligung an der Entstehung der fetalen Immuntoleranz [99], der Tumortoleranz [115] und von Autoimmunerkrankungen widerspiegelt [116].



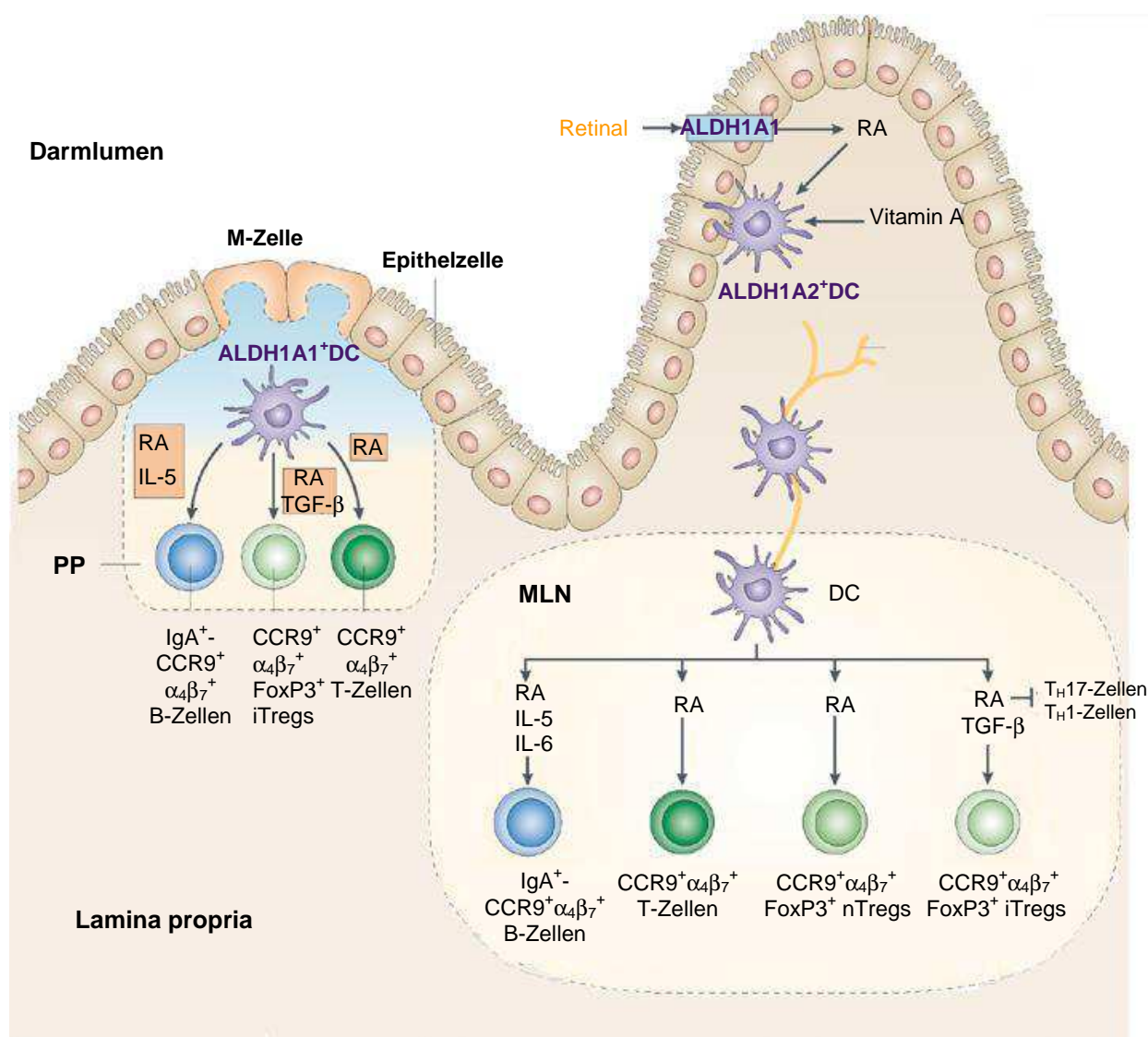
#### 1.2.4.2 Vitamin A-Stoffwechsel dendritischer Zellen

Die aktiven Metaboliten des Vitamin-A-Stoffwechsels, all-trans-Retinsäure (ATRA) und 9-cis-Retinsäure, haben ihre Hauptfunktion in der Regulation der Zellproliferation und der Wachstums- und Differenzierungsprozesse. Die Funktionsbereiche erstrecken sich auf den Sehvorgang, die Reproduktions- und Embryonalentwicklung, die Epitheldifferenzierung, sowie die Skelett- und Bindegewebsentwicklung und die Beteiligung an immunologischen Prozessen [117, 118]. Vitamin A wird als  $\beta$ -Carotin mit der Nahrung aufgenommen und im Dünndarm zu Retinol umgewandelt. Ein kleiner Teil gelangt direkt in die Leber, wobei der größte Anteil in Retinylester zurückverwandelt wird und mittels Chylomikronen zur Leber transportiert und dort gespeichert wird. In Abhängigkeit vom Serumlevel des Retinols (Norm 1-2  $\mu$ M), erfolgt bei Bedarf die Hydrolyse des Esters zu Retinol, welches im Blutserum an das „retinol-binding-protein“ (RBP) gebunden ist. Nach Aufnahme in die Zelle wird all-trans-Retinol über eine Alkoholdehydrogenase (ADH) zu all-trans-Retinal metabolisiert, welches in einem irreversiblen Schritt durch die Aldehyd-Dehydrogenase 1A (ALDH1A) in den aktiven Metabolit ATRA verwandelt wird [119, 120]. Die erwähnte 9-cis-Retinsäure entsteht hierbei entweder durch die spontane Isomerisierung aus ATRA oder durch die Oxidation von 9-cis-Retinal über ALDH1A [121]. Es existieren vier Isoformen der ALDH1A, ALDH1A1-4, wovon ALDH1A1-3 in DCs sekundärer Lymphorgane, wie den Peyer-Plaques oder den mesenterialen Lymphknoten exprimiert werden [122, 123]. Zudem wird vor allem ALDH1A1 in intestinalen Epithelzellen (IEC, *intestinal epithelial cell*) exprimiert [124].

Die Retinsäure (RA, *retinoic acid*) bindet als lipophiles Molekül an die intrazellulären Rezeptoren RAR (all-trans-Retinsäure-Rezeptor) und RXR (9-cis-Retinsäure-Rezeptor) im Zytoplasma und interagiert unter Bildung von Heterodimeren (RXR-RAR) mit den RARE (*retinoic acid response elements*) im Zellkern, die in den Promotoren der RA-abhängigen Gene liegen [117]. Wie in Mausmodellen veranschaulicht werden konnte, sind intestinale DCs durch die Expression der Vitamin-A-metabolisierenden Enzyme tatsächlich auch in der Lage, in Anwesenheit von RA Retinsäure zu produzieren [125, 126]. Aktivierte intestinale DCs in sekundären Lymphorganen des Darms erzeugen, bei Anwesenheit von TGF- $\beta$ , RA-abhängig die Bildung von FoxP3<sup>+</sup> iTregs [127, 128]. Des Weiteren spielt RA eine wesentliche Rolle in der Induktion des „Homings“ von T-Zellen. Im Gegensatz zu naiven T-Zellen ist es nur aktivierten T-Lymphozyten möglich in nicht-lymphatische Gewebe einzutreten, um dort ihre Funktion ausüben zu können [129, 130]. Hierbei entscheidet die lymphatische Umgebung, in der die T-Zellen von DCs aktiviert wurden, über deren „Homing“-Spezifität, wobei das Darm-„Homing“ von RA abhängig ist [131-133]. Murine intestinale DCs induzieren dabei in Abhängigkeit von RA auf T- und B-Zellen sowie insbesondere auf FoxP3<sup>+</sup> nTregs und FoxP3<sup>+</sup> iTregs die Expression der „Homing“-Rezeptoren  $\alpha_4\beta_7$  und CCR9, die für das Darm-„Homing“ essentiell sind [133-137]. Zudem induzieren intestinale DCs RA-abhängig neben FoxP3<sup>+</sup> iTregs die Generierung von T<sub>H</sub>2-Zellen, bei gleichzeitiger Suppression der T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>17-Antwort [138-141]. Des Weiteren führt die Kombination von RA mit IL-5 und IL-6 zur verstärkten IgA-Produktion durch B-Zellen, die einen natürlichen Abwehrmechanismus gegenüber kommensalen Bakterien im Darm bilden [22, 142] (siehe Abbildung 1.4).



Insbesondere durch die Generierung von FoxP3<sup>+</sup> iTregs sowie durch die Induktion des Darm-„Homing“ von Tregs, scheint RA eine wichtige Funktion im Rahmen der Aufrechterhaltung der Darmhomöostase innezuhaben. Allerdings ist insgesamt wenig über die genauen Wirkmechanismen von RA und dessen Effekte im Hinblick auf humane Zellen, insbesondere auf humanen Immunzellen bekannt, da die meisten Untersuchungen bei Mäusen durchgeführt wurden.



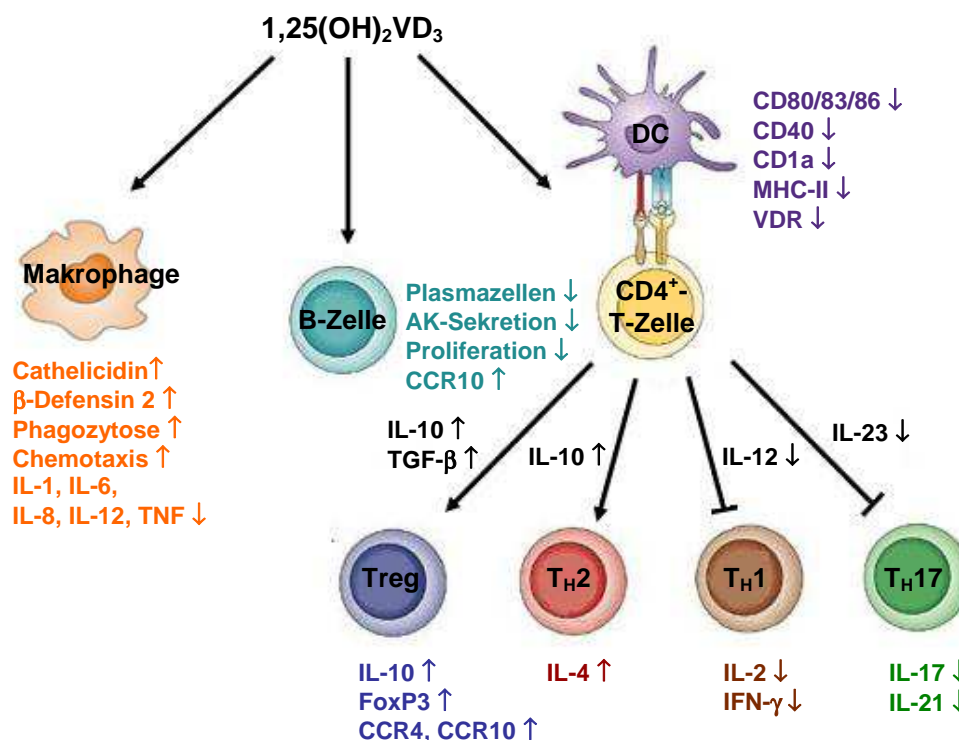
**Abbildung 1.4: Einfluss von Retinsäure auf die Funktion von intestinalen dendritischen Zellen**

Intestinale DCs in Peyer-Plaques (PP) und in mesenterialen Lymphknoten (MLN, *mesenterial lymph node*) sind in der Lage, mittels Expression von ALDH1A1 und -A2, Retinsäure (RA, *retinoic acid*) aus Retinal zu produzieren. Zusammen mit TGF-β führt RA zur Bildung von FoxP3<sup>+</sup> iTregs, bei gleichzeitiger Hemmung der proinflammatorischen T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>17-Zellen. Außerdem induzieren intestinale DCs in Abhängigkeit von RA die Expression der Darm-„Homing“-Rezeptoren CCR9 und α<sub>4</sub>β<sub>7</sub> auf T- und B-Zellen sowie auf FoxP3<sup>+</sup> iTregs und FoxP3<sup>+</sup> nTregs. Abbildung nach [143], modifiziert.

### 1.2.4.3 Vitamin D<sub>3</sub>-Stoffwechsel dendritischer Zellen

Der aktive Metabolit des Vitamin D<sub>3</sub> (VD<sub>3</sub>)-Stoffwechsels 1,25-Dihydroxy-VD<sub>3</sub> (1,25(OH)<sub>2</sub>-VD<sub>3</sub>) hat neben der Regulation des Knochen-, Kalzium- und Phosphatstoffwechsels eine wichtige immunmodulatorische Aufgabe [144]. Die Entstehung von 1,25(OH)<sub>2</sub>-VD<sub>3</sub> beginnt in der Haut, wo es über UVB-abhängige Photolyse aus 7-Dehydrocholesterol VD<sub>3</sub> gewonnen wird. Ebenso kann VD<sub>3</sub> über die Nahrung aufgenommen werden. Das im Blut an das „Vitamin-D-binding-protein“- (DBP) gebundene VD<sub>3</sub> wird zur Leber transportiert [145]. Dort erfolgt mittels einer Sterol-27-Hydroxylase (CYP27A1) die Hydroxylierung von VD<sub>3</sub> an der C25-Position zu 25-Hydroxy-VD<sub>3</sub> (25(OH)-VD<sub>3</sub>), welches die Speicherform von VD<sub>3</sub> darstellt und im Gegensatz zur aktiven Form in tausendfach höherer Konzentration in unserem Körper vorherrscht (ausreichende 25(OH)-VD<sub>3</sub>-Konzentration im Körper: > 75 nmol/l; 25(OH)-VD<sub>3</sub>-Mangel: < 25 nmol/l) [146, 147]. Der letzte Metabolisierungsschritt zum aktiven Metaboliten 1,25(OH)<sub>2</sub>-VD<sub>3</sub> erfolgt in der Niere durch die Hydroxylierung von 25(OH)-VD<sub>3</sub> an der C1 $\alpha$ -Position durch das Enzym 25-Hydroxy-VD<sub>3</sub>-1 $\alpha$ -Hydroxylase (CYP27B1). CYP27B1 wird bevorzugt in den proximalen Tubuluszellen der Niere exprimiert [148], jedoch auch in der Haut, dem Endothel, der Dezidua der Plazenta, sowie dem Kolon und lymphatischen Organen [149-151]. Durch die Expression von sowohl CYP27A1 als auch CYP27B1 sind auch Makrophagen und DCs in der Lage, beide Metabolite des VD<sub>3</sub>-Stoffwechsels zu bilden [152-154]. Der Abbau von 25(OH)-VD<sub>3</sub> sowie der aktiven Form erfolgt über das Enzym CYP24A1, welches im Darm und der Niere lokalisiert ist. Die Abbauprodukte der Metaboliten werden über die Galle bzw. den Urin ausgeschieden [152, 155, 156]. Die Haupteffekte vermittelt 1,25(OH)<sub>2</sub>-VD<sub>3</sub> als lipophiles Molekül über den nukleären Vitamin D-Rezeptor (VDR). Der Ligand-VDR-Komplex bildet zusammen mit dem Rezeptor RXR Heterodimere, die an VDREs (*Vitamin D<sub>3</sub> response element*) binden, die sich in den Promotoren der Zielgene befinden [157]. 1,25(OH)<sub>2</sub>-VD<sub>3</sub> zeigt sowohl auf das angeborene als auch das adaptive Immunsystem immunmodulierende Effekte. 1,25(OH)<sub>2</sub>-VD<sub>3</sub> hat durch die Herabregulation der kostimulatorischen Marker CD40, CD80 und CD86, sowie der MHC-II-Moleküle einen inhibitorischen Effekt auf die Reifung und Antigenpräsentationsfähigkeit von humanen DCs [158, 159]. Um eine übermäßige Immunantwort zu verhindern, kommt es im Rahmen einer LPS-, TNF- oder IFN $\gamma$ -induzierten Reifung von DCs zu einer verstärkten Expression von CYP27B1 bei gleichzeitiger Herabregulation des VDR. Diese DCs zeigen demzufolge ein vermindertes Ansprechen auf das immunsuppressive 1,25(OH)<sub>2</sub>-VD<sub>3</sub>, können aber gleichzeitig durch eine vermehrte 1,25(OH)<sub>2</sub>-VD<sub>3</sub>-Produktion über parakrine Wege eine zusätzliche Differenzierung ihrer Vorgänger verhindern und somit das Ausmaß der Immunreaktion regulieren [153, 154, 160, 161]. Zudem induziert 1,25(OH)<sub>2</sub>-VD<sub>3</sub> die Freisetzung von IL-10 sowie eine erhöhte Expression von IDO in den DCs, was die Generierung von Tregs zur Folge haben kann [162-164]. Im Gegensatz dazu zeigt 1,25(OH)<sub>2</sub>-VD<sub>3</sub> einen positiven Einfluss auf die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen, deren Phagozytosekapazität sowie auf die Bildung antimikrobieller Peptide wie Cathelicidin und  $\beta$ -Defensin 2 [165, 166]. Des Weiteren beeinflusst 1,25(OH)<sub>2</sub>-VD<sub>3</sub> die T-Zellantwort auf unterschiedliche Weise. Einerseits inhibiert 1,25(OH)<sub>2</sub>-VD<sub>3</sub> die Entwicklung einer T<sub>H</sub>1-Antwort, indem es die Freisetzung

von IL-12 durch DCs vermindert [156, 167]. Zudem dämpft es durch die Inhibition der Bildung von IL-2 und IFN- $\gamma$  die proinflammatorische Aktivität und Proliferation der T<sub>H</sub>1-Zellen [165, 168]. 1,25(OH)<sub>2</sub>-VD<sub>3</sub> hat des Weiteren durch eine Herabregulation von IL-6 und IL-23, einen hemmenden Einfluss auf die T<sub>H</sub>17-Antwort [169, 170]. Durch die Hemmung der B-Zellproliferation, die Plasmazelldifferenzierung und der IgG-Sekretion zeigt 1,25(OH)<sub>2</sub>-VD<sub>3</sub> ebenfalls einen wesentlichen Einfluss auf die humorale Immunabwehr [165]. Andererseits fördert Vitamin D<sub>3</sub> die Entstehung von T<sub>H</sub>2-Zellen und induziert zusammen mit IL-10 und TGF- $\beta$  die Generierung von iTregs [158, 165, 171, 172].



**Abbildung 1.5: Einfluss von 1,25-Dihydroxy-Vitamin D<sub>3</sub> auf Immunzellen**

Der aktive Vitamin D<sub>3</sub>-Metabolit 1,25(OH)<sub>2</sub>-VD<sub>3</sub> hat eine Vielzahl an immunmodulatorischen Eigenschaften. Makrophagen und DCs sind durch die Expression von CYP27B1 in der Lage, 1,25(OH)<sub>2</sub>-VD<sub>3</sub> zu produzieren, ihre eigene Aktivität zu regulieren und umgebende Immunzellen durch parakrine Sekretion des Vitaminmetaboliten in ihrer Funktion zu beeinflussen. 1,25(OH)<sub>2</sub>-VD<sub>3</sub> steigert einerseits die Phagozytosekapazität von Makrophagen und hemmt andererseits die Antigenpräsentationsfähigkeit von DCs. Zudem inhibiert es die T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>17-Antwort, indem es die Sekretion von IL-12 und IL-23 durch DCs hemmt. Gleichzeitig erzeugt 1,25(OH)<sub>2</sub>-VD<sub>3</sub> über IL-10 und TGF- $\beta$  die Bildung von Tregs und T<sub>H</sub>2-Zellen. Des Weiteren induziert es die Expression der „Homing“-Rezeptoren CCR4 und CCR10 in T-Zellen. Abbildung nach [69, 173], modifiziert.

Ebenso wie RA hat 1,25(OH)<sub>2</sub>-VD<sub>3</sub> einen Einfluss auf das „Homing“ von Immunzellen. Es induziert die Expression der „Homing“-Rezeptoren CCR4, CCR10 und die Liganden von E- und P-Selektin nach DC-T-Zellinteraktion in Haut-drainierenden Lymphknoten [174-177]. Interessanterweise blockt RA hingegen die Hochregulation der „Homing“-Rezeptoren CCR4 und der Liganden für E- und P-Selektin in T-Zellen, wobei 1,25-(OH)<sub>2</sub>-VD<sub>3</sub> die Expression von  $\alpha_4\beta_7$  und CCR9 hemmt. Hierbei stehen die Rezeptoren der beiden Vitamine VDR und RAR in Konkurrenz um die Bindung ihres gemeinsamen Rezeptors RXR und sind somit in der Lage, den Effekt des anderen Vitamins zu inhibieren bzw. zu antagonisieren [177-179].

### 1.3 GvHD als Komplikation der allogenen Stammzelltransplantation

Die „Graft-versus-Host-Disease“ (GvHD) stellt neben dem Auftreten von Rezidiven der Grunderkrankung die bedeutendste Komplikation bei allogener Stammzelltransplantation dar [180]. Trotz gesunkener transplantationsassoziiierter Mortalität (TRM, *transplant related mortality*) [181] ist sie dennoch heute noch hauptverantwortlich für eine Vielzahl an Komplikationen und Todesfällen. Aus diesem Grund beschäftigt sich die Forschung mit der Pathophysiologie der GvHD, um Informationen für eine effektive Prävention und neue Therapieansätze zu gewinnen.

#### 1.3.1 Stammzelltransplantation

Die hämatopoetische Stammzelltransplantation (SZT) stellt die meist einzige kurative Therapieoption sowohl bei hämatologischen Erkrankungen wie Leukämien, Lymphomen, lymphoproliferative Erkrankungen als auch bei aplastischer Anämie, seltenen Immundefekten und Hämoglobinopathien (z.B. Thalassaemia major, Sichelzellanämie) dar [182, 183]. Ziel der Transplantation von Spenderzellen ist das Erreichen eines kompletten Spenderchimärismus. Hierbei übernehmen die transplantierten Zellen nach Anwachsen im Knochenmark (sogenanntes Engraftment) die komplette Blutbildung sowie den Aufbau eines funktionierenden Immunsystems des Empfängers [184]. Zudem verdrängen sie dessen übrige Zellen bzw. töten im besten Fall maligne Zellen durch den sogenannten „Graft-versus-Leukämie“ (GvL) – Effekt ab [185].

Vor der Transplantation erfolgt eine sogenannte myeloablative Konditionierung im Rahmen einer hochdosierten Radio- und/oder Chemotherapie, die über die Grenze der Hämatotoxizität hinausgeht [184, 186]. Diese hat zum Ziel, eine ausreichend immunsuppressive Wirkung auf die Zellen des Empfängers auszuüben, um eine immunologische Abstoßungsreaktion des Transplantats zu verhindern und verbliebene bösartige hämatopoetische Zellen zu eliminieren [187].

Im Rahmen der Spenderauswahl bei der Stammzelltransplantation spielt primär die Übereinstimmung der HLAs (Humanes Leukozyten-Antigen), die durch den Hauptkompatibilitätskomplex (MHC) kodiert werden, eine entscheidende Rolle [188, 189]. Die optimale Ausgangslage einer allogenen SZT wäre die komplette Übereinstimmung der HLA-Proteine, da die immunogenetische Inkompatibilität das Risiko des Auftretens einer GvHD und eines Transplantversagens deutlich erhöht [190, 191]. Aus diesem Grund wird vor Transplantation eine HLA-Typisierung des Spenders und des Empfängers bezüglich HLA I-A, -B und -C und HLA-II-DR und -DQ durchgeführt. Nichtsdestotrotz ist bei fast 50 % der Empfänger, die Stammzellen von einem HLA-identischen, verwandten Spender erhalten und bei 80 % der Empfänger, die Stammzellen von einem HLA-kompatiblen, nicht-verwandten Spender transfundiert bekommen, eine akute GvHD zu beobachten [192]. Diese Resultate lassen sich anhand von Unterschieden der Minorhistokompatibilitätsantigene (mHA) zwischen Empfänger und Spender erklären [193-195].

Insgesamt führt die SZT bei vielen Erkrankungen, wie vor allem der akuten Leukämie, abhängig von den Risikofaktoren, in ca. 50-70% zur vollständigen Remission der Tumorerkrankung. Je früher der Therapiebeginn gewählt wird, desto höher ist die Heilungsrate. Bei zu spätem Einleiten der therapeutischen SZT sinkt die Remissionsrate auf 20-40% [196].

Sowohl das Patientenalter, die Schwere der Grunderkrankung, das HLA-Mismatch, die Konditionierung, die GvHD-Prophylaxe, ein Mismatch des Geschlechts als auch die Stammzellquelle haben Einfluss auf die Prognose und den Erfolg der SZT [197]. Hinzu kommen die Komplikationen der SZT, bestehend aus vielfältigen Infektionen mit Bakterien, Viren oder Pilzen, einem möglichen Transplantatversagen und der GvHD.

### **1.3.2 Graft-versus-Host-Disease (GvHD)**

Die GvHD beschreibt die klinische Manifestation der immunologischen Reaktion der Spender-T-Lymphozyten gegen Alloantigene des Empfängers, die auf der Zelloberfläche von Empfänger-APCs präsentiert werden und vor allem bei allogener SZT zu beobachten ist [198-200]. Die Erkrankung zeichnet sich durch eine rasch voranschreitende Entzündungsreaktion in verschiedenen Organen, wie der Leber, der Haut, des Darms und der Lunge aus [201-203].

#### **1.3.2.1 Klinik der akuten GvHD**

Man unterscheidet anhand ihres Manifestationszeitpunktes zwischen einer akuten Form, die innerhalb der ersten 100 Tage nach der SZT eintritt, und einer chronischen Form, die sich ab dem 100. Tag nach Transplantation manifestiert [204].

Klinisch äußert sich die akute Haut-GvHD durch einen charakteristischen makulopapulösen, stark juckenden Ausschlag, der sich über den ganzen Körper mit Aussparungen im Bereich der Kopfhaut ausbreiten kann [202]. Die Manifestation der Darm-GvHD äußert sich gewöhnlich durch eine sekretorische und oft voluminöse Diarrhoe, oft verbunden mit Übelkeit, Anorexie sowie abdominellen Schmerzen und Blutbeimengungen im Stuhl [201]. Der Leberbefall bei akuter GvHD zeichnet sich durch eine cholestatische Hyperbilirubinämie, einem unspezifischen Transaminasenanstieg, bis hin zur Hepatomegalie mit Entwicklung von Aszites aus [205, 206]. Die Mitbeteiligung der Lunge zeigt sich durch das Bild eines idiopathischen Pneumonie-Syndroms und einer diffusen nichtinfektiösen Lungenentzündung [207].

Im Verlauf kann sich die akute GvHD vollständig zurückbilden oder in eine chronische GvHD übergehen. Dies lässt sich durch fehlende Suppressionsmechanismen erklären, die normalerweise zu einer Toleranzentwicklung gegenüber den Alloantigenen führen [204].

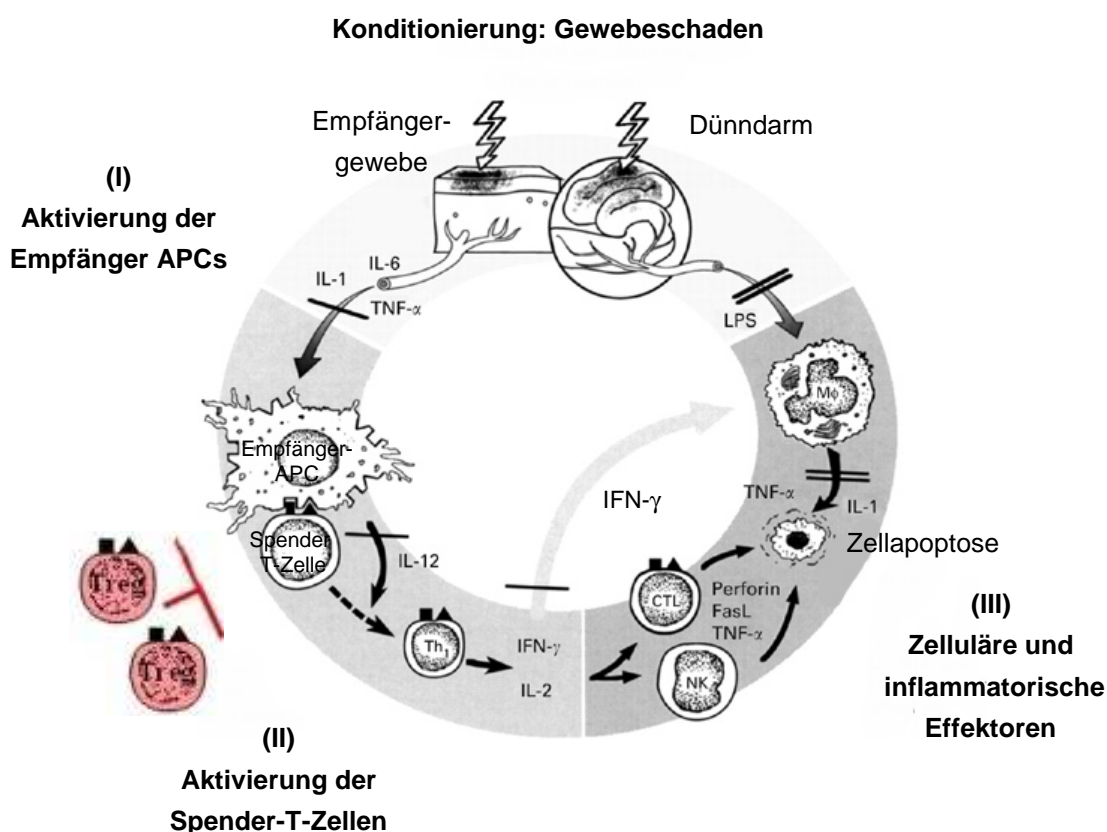
#### **1.3.2.2 Pathophysiologie der akuten GvHD**

Trotz der Komplexität der Pathogenese der akuten GvHD hat sich für die Veranschaulichung der Pathophysiologie das Drei-Phasen-Modell etabliert [208-210]. Die drei aufeinander folgende Prozesse bestehen aus der Aktivierung von Empfänger-APCs (Phase I), aus der Akti-

vierung, Proliferation, Differenzierung und Migration von Spender-T-Lymphozyten (Phase II) und aus der Gewebszerstörung der Zielorgane (Phase III).

### *Phase I: Aktivierung der Empfänger-APCs*

Durch die in der Konditionierungstherapie gesetzten Gewebsschäden, vor allem der intestinalen Mukosa und der Leber, kommt es zur Aktivierung des Immunsystems und der Induktion der proinflammatorischen Zytokine wie TNF, IL-1 und IL-6, verschiedener Chemokine und Adhäsionsmoleküle [211-214]. Außerdem werden Empfänger-APCs, wie DCs, aktiviert, mit der Folge der erhöhten Expression kostimulatorischer Moleküle, wie CD80, CD86 und MHC-II-Komplexen, auf der Oberfläche der Immunzellen sowie der Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie IL-12 [209, 215]. Im Zuge der Aktivierung der DCs kommt es auch zur Hochregulierung von Chemokinrezeptoren, wodurch APCs verstärkt in periphere Lymphknoten migrieren, um dort Spender-T-Zellen zu aktivieren [216, 217] (siehe Abbildung 1.6).



**Abbildung 1.6: Pathophysiologie der „Graft-versus-Host-Disease“ (GvHD)**

In Phase I kommt es durch die in der Konditionierungstherapie gesetzten Gewebsschäden in den betroffenen GvHD-Organen zur Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF, IL-1 und IL-6. Erhöhte Level dieser Zytokine führen zur Aktivierung von APCs des Empfängers. In Phase II aktivieren diese APCs allogene Spender-T-Zellen, die sich durch die Anwesenheit des proinflammatorischen IL-12 vorwiegend zu  $T_H1$ -Zellen differenzieren. Phase III ist durch die Zerstörung des Zielgewebes gekennzeichnet. Die von den aktivierten Spender-T-Zellen sezernierten Zytokine IL-2 und IFN- $\gamma$  führen zur Induktion von zytotoxischen T-Zellen, NK-Zellen sowie der Aktivierung von Makrophagen, die die gewebsdestruierenden Effekte bewirken. LPS gelangt über die zerstörte Epithelbarriere ins Gewebe und verstärkt die TNF- und IL-1-Produktion in Makrophagen, was die Nekrose und Apoptose der Zielzellen bewirkt. Abbildung nach [204], modifiziert.

*Phase II: Aktivierung der Spender-T-Lymphozyten*

Die in die Lymphknoten migrierten DCs werden dort von allo-genen Spender-T-Zellen anhand der exprimierten HLAs und mHAs als fremd erkannt und führen zu deren Aktivierung. Im Rahmen der akuten GvHD veranlasst das von den aktivierten DCs sezernierte IL-12 überwiegend die Differenzierung der naiven Spender-T-Lymphozyten zu T<sub>H</sub>1-Zellen [204]. Die Hochregulation von Chemokinrezeptoren auf den aktivierten T-Zellen [218-224] und die Sekretion von Chemokinen durch Gewebsmakrophagen und DCs im den GvHD-Zielorganen als Reaktion auf die proinflammatorischen Stimuli [218, 225-227] ermöglicht den Effektor-T-Lymphozyten den Austritt in nichtlymphatisches, epitheliales Gewebe.

*Phase III: Zelluläre und inflammatorische Effektorphase*

Die von den Spender-T-Lymphozyten sezernierten proinflammatorischen Zytokine IL-2 und IFN- $\gamma$  führen im Zielgewebe zur Generierung von zytotoxischen T-Zellen und NK-Zellen sowie der Aktivierung von Makrophagen, die eine Gewebsdestruktion der Zielorgane verursachen [204]. Des Weiteren spielt die Translokation von bakteriellen Bestandteilen wie LPS durch die geschädigte Epithelbarriere in das Gewebe eine wesentliche Rolle [228-230], was unter anderem zur Aktivierung von DCs und Makrophagen führt [4, 204, 225, 231]. Regulatorische T-Zellen sind jedoch in der Lage, die Entzündungsantwort durch die Inhibition der Spender-T-Zellen zu dämpfen und spielen daher eine essentielle Rolle in der Pathogenese der GvHD [204].

**1.3.3 Rolle von DCs in der akuten GvHD**

Die Translokation der bakteriellen Komponenten hat einen bedeutenden Stellenwert in der Pathophysiologie der GvHD, da es in Studien mehrfach belegt werden konnte, dass sich durch eine präventive Darmdekontamination bzw. keimfreie Bedingungen eine Induktion einer GvHD im Tiermodell weitgehend vermeiden ließ, was zu einer verminderten Mortalitätsrate im Rahmen der GvHD und sinkenden GvHD-Inzidenzen führte [232-237]. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit der Tatsache, dass alle betroffenen GvHD-Organen in Kontakt mit Epitheloberflächen stehen, welche mit Bakterien und deren Komponenten interagieren [238]. Da DCs als Teil des angeborenen Immunsystems hauptverantwortlich für die Detektion dieser bakteriellen Bestandteile sind, scheint es demnach nicht verwunderlich, dass ihnen in der Induktion der Spender-T-Zell-Aktivierung und somit der akuten GvHD eine essentielle Rolle zugesprochen wird [214, 239, 240]. Insbesondere werden PRRs wie NOD2, TLR4 und TLR5 in Verbindung mit der Pathogenese der akuten GvHD gebracht.

**1.3.3.1 Die Rolle von PRRs und ATG16L1 in der GvHD**

NOD2 wird eine besondere Bedeutung im Hinblick auf die Entwicklung der GvHD sowie der von Morbus Crohn zugeschrieben. Es sind derzeit drei Polymorphismen der Leucin-reichen Region (R702W; G908R; L1007fsinsC) von NOD2/CARD15 beschrieben, die das Risiko für



das Auftreten von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) erhöhen [241, 242] und in Assoziation mit der Inzidenz, der Schwere und der Mortalität der GvHD stehen [207, 243-246]. Besonders die Polymorphismen in hämatopoetischen Zellen des Empfängers scheinen zu einer verstärkten Proliferation und Aktivierung von alloreaktiven Effektor-T-Zellen zu führen, was mit einer Verschlimmerung der GvHD im Mausmodell einhergeht [247]. Von besonderer Bedeutung ist zudem die Tatsache, dass NOD2-SNPs (SNP, *single nucleotide polymorphism*) des Empfängers mit einem signifikanten Verlust von CD4<sup>+</sup> T-Zellen, insbesondere Tregs der Haut und des Darms, assoziiert sind [248]. Zudem erfolgt die Produktion von  $\alpha$ -Defensinen in Panethzellen des Darms NOD2-abhängig, wobei bei NOD2-Mangel eine verstärkte Infektanfälligkeit bei Mäusen beobachtet werden konnte [249, 250]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass NOD2 die Generierung von proinflammatorischen T<sub>H</sub>1-Zellen inhibiert und Mäuse vor experimenteller Kolitis schützt [251-253]. NOD2 scheint demzufolge eine wichtige Funktion in der Aufrechterhaltung der Immunhomöostase innezuhaben, die im Falle der GvHD bei NOD2-Polymorphismen gestört wird.

Wie in Kapitel 1.2.2.2 erläutert, induziert NOD2 die Autophagozytose in humanen DCs in Abhängigkeit von ATG5, ATG7 und ATG16L1. Man vermutet eine Assoziation zwischen NOD2- bzw. ATG16L1-Polymorphismen und einer gestörten Autophagozytose im Rahmen der CED [48, 50, 254, 255]. Dies hat die Induktion einer übermäßigen Immunantwort zur Folge, was möglicherweise darauf beruht, dass die immunologische Synapse bei DC-T-Zellinteraktion zu stabil ist, wodurch es zu einer verstärkten T-Zell-Aktivierung kommt. Unter physiologischen Bedingungen induziert die DC-T-Zell-Interaktion nämlich die ATG-abhängige Bildung von Autophagosomen, die die Komponenten der immunologischen Synapse kontrolliert abbauen sollen und somit das Ausmaß der Immunantwort regulieren [256].

Des Weiteren spielt LPS als proinflammatorischer Stimulus eine essentielle Rolle in der Pathogenese der GvHD, da gezeigt werden konnte, dass durch die Antagonisierung von LPS und dessen induzierten Zytokinen wie TNF und IL-1 $\beta$  die Schwere und Inzidenz der akuten GvHD deutlich reduziert werden konnte [228, 257, 258]. Mutationen des LPS-Rezeptors TLR4 (Thr3999Ile) erhöhen allerdings die Infektanfälligkeit gegenüber gramnegativen Bakterien sowie die Inzidenz einer schweren GvHD [244, 259, 260]. Des Weiteren scheint die Expression von TLR4 im Empfängerorganismus im Mausmodell essentiell für die Induktion von Gewebeschutzfaktoren und dem Schutz gegen die Apoptose von Darmzellen während der GvHD zu sein [261].

Bezüglich des Einflusses von TLR5 auf das Immunsystem und die allogenen Immunreaktionen bestehen widersprüchliche Meinungen. Einerseits lässt sich in Mäusen mit TLR5-Defizienz durch die Stimulation mit Flagellin eine spontane Kolitis auslösen, was für eine schützende Funktion von TLR5 im Darmmilieu spricht [262, 263]. Zudem führt die Stimulation mit Flagellin in Tiermodellen zu einer Reduktion der GvHD bei gleichzeitigem Anstieg der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> Spender-Tregs [264]. Andererseits sind TLR5-SNPs mit einer verminderten Entwicklungsrate von CEDs assoziiert [265, 266].



### **1.3.3.2 Die Rolle von IDO in der GvHD**

Im Rahmen der Darm-GvHD wird IDO, welches infolge einer proinflammatorischen Stimulation von DCs verstärkt exprimiert wird, in Tiermodellen eine wichtige Regulatorfunktion zugesprochen. Bei IDO-Mangel ließ sich eine deutlich erhöhte GvHD-Letalität durch eine verstärkte Proliferation und gleichzeitig verminderte Apoptoserate von Empfänger-T-Zellen beobachten [267-269]. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Höhe an Kynurenin und die Expression von IDO auf humanen Zellen aus Darmbiopsien in positiver Korrelation mit der Schwere und dem Ausmaß der klinischen Manifestationen der GvHD stehen [270].

### **1.3.3.3 Die Rolle von Vitamin D<sub>3</sub> in der GvHD**

Im Tiermodell konnte die Applikation von MC1288, einem VD<sub>3</sub>-Analogon, vor klinischen und histologischen Zeichen der GvHD schützen [271]. Des Weiteren lässt sich bei schweren Formen der GvHD, nach anfänglichem Abfall von 25(OH)-VD<sub>3</sub> und 1,25(OH)<sub>2</sub>-VD<sub>3</sub> in der Ap-lasie- bzw. Engraftmentphase, im Gegensatz zu milden GvHD-Formen bzw. dem Auftreten keiner GvHD, kein erneuter Anstieg der Vitaminmetabolite messen [272]. Es wurde außerdem ein Polymorphismus des VDR beschrieben, der mit einer schlechteren Überlebensrate von GvHD-Patienten in Assoziation gebracht werden konnte [273]. Gorman *et al.* beschrieben einen synergistischen Einfluss von 1,25(OH)<sub>2</sub>-VD<sub>3</sub> und UVB-Licht auf die suppressive Funktion von Tregs in der Haut [274]. Dies steht im Einklang mit einer neuen Studie, in der gezeigt werden konnte, dass eine prophylaktische UVB-Bestrahlung nach SZT das Ausmaß der GvHD deutlich vermindern konnte. Dies korrelierte mit einer verminderten Anzahl von Langerhanszellen und dermalen DCs des Empfängers, signifikant steigenden 25(OH)VD<sub>3</sub>-Leveln sowie einer erhöhten Anzahl an zirkulierenden CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> Tregs [275].

## 2 Zielsetzung

Die Aktivierung dendritischer Zellen ist ein zentraler Faktor in der Pathogenese der GvHD. Dendritische Zellen sind in der Lage, über TLRs und NLRs eine Vielzahl von bakteriellen Komponenten zu detektieren und sind im Rahmen der GvHD hauptverantwortlich für die Induktion der Aktivierung von allopathen Spender-T-Zellen.

Daher soll in dieser Arbeit der Einfluss verschiedener bakterieller Bestandteile wie LPS, Flagellin und MDP auf DCs evaluiert werden. Hierbei steht vor allem die Frage der allopathen T-Zellpolarisierung im Vordergrund, d.h. inwieweit die unterschiedliche Stimulation der DC Einfluss auf ihr stimulatorisches Potential gegenüber T-Zellen hat und das Profil der allopathen CD4<sup>+</sup> T-Zellantwort verändert. Um diese Frage zu klären, sollen einerseits die DCs bezüglich der Expression von stimulatorischen Oberflächenantigenen sowie der Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen untersucht werden und andererseits die aus der Kokultur resultierende allopathen T-Zellantwort bezüglich der Proliferation und dem Zytokinprofil sowie der FoxP3-Expression analysiert werden.

Zudem ist von besonderem Interesse, ob die bakteriellen Stimuli unterschiedliche immunregulatorische Mechanismen in den DCs induzieren, die unter physiologischen Bedingungen die Immunhomöostase aufrechterhalten und erst bei einem NOD2-Polymorphismus gestört sind, und so das Ausmaß der GvHD verschlimmern könnten. Hierzu soll die mRNA-Expression der immunregulatorischen Enzyme *IDO*, *CYP27B1* und *ALDH1A1-3* in den DCs sowie der Einfluss der DCs bei Anwesenheit von 25-Hydroxy-Vitamin D<sub>3</sub> auf die allopathen T-Zellproliferation analysiert werden.

### 3 Material

#### 3.1 Geräte

Gerät	Firma, Ort
Autoklav	Walter, Greislingen
Elektrophoreseapparaturen	Biometra, Göttingen
Elutriator Avanti J-20XP	Beckmann Coulter, Krefeld
CASY Zellzählgerät	Schärfe System, Reutlingen
FACS Calibur	BD Biosciences, Heidelberg
Inkubatoren BBD 6220	Heraeus, Osterode
Kamera AxioCam HRc	Zeiss, Jena
Magnetrührer MR 3001 K	Heidolph, Schwabach
Mikroskope	Zeiss, Jena
Mikrotiterplatten-Waschgerät	Thermo Fisher, Langenselbord
Mikrowelle Privileg 8020	Privileg, Fürth
Multipipettor Multipette plus	Eppendorf, Hamburg
NanoDrop ND1000	PeqLab, Erlangen
Netzgeräte	Biometra, Göttingen
Neubauerzählkammer	Marienfeld, Lauda-Königshofen
PCR-Thermocycler Modell PTC-200	MJ-Research/Biometra, Göttingen
pH-Meter	Knick, Berlin
pH-Meter, tragbar	Hanna Instruments, Kehl am Rhein
Photometer	MWG-Biotech, Ebersberg
Picofuge	Heraeus, Osterode
Realplex Mastercycler epGradient S	Eppendorf, Hamburg
Schweißgerät für PCR-Platten Fermant 400	Josten & Kettenbaum, Bensberg
Sterilbank Lamin Air HA 2472	Heraeus, Osterode
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Trennkammer für Gegenstromzentrifugation	Beckmann, München
Vortexer	Scientific Industries, New York, USA
Waage LP1200S	Sartorius, Göttingen
Wallac-Betaplate Zähler	PerkinElmer, Rodgau
Wallac-Erntegerät	PerkinElmer, Rodgau
Wasseraufbereitungsanlage	Millipore, Eschborn
Zentrifuge Avanti J-20XP; Rotor JE 5.0	Beckmann, München
Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus, Osterode
Zentrifuge J6M-E	Beckmann, München
Zentrifuge Megafuge 3,0 R	Heraeus, Osterode
Zentrifuge Sigma 2	Sartorius, Göttingen

### 3.2 Verbrauchsmaterialien

Materialien	Firma, Ort
Adhäsionsobjektträger	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Deckgläser	Marienfeld, Lauda-Königshofen
dickwandige Reaktionsgefäße (0,1 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Dispenserspitzen für Multipette plus	Eppendorf, Hamburg
Einmalkanülen	Becton Dickinson, Heidelberg
Einmalspritzen	Becton Dickinson, Heidelberg
Heat sealing film	Eppendorf, Hamburg
Mikrotiterplatten (6, 12, 96 Vertiefungen)	Falcon, Heidelberg
Mikrotiterplatten für ELISA	Costar, Cambridge, USA
PCR-Platten Twin.tec (96 Vertiefungen)	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Polystyrolröhrchen	Falcon, Heidelberg
Reaktionsgefäße (0,5 ml; 1,5 ml; 2,0 ml)	Eppendorf, Hamburg
Spritzen	Becton Dickinson, Heidelberg
Sterilfilter	Millipore, Eschborn
TopSeal-A-Folien	Perkin Elmar, Rodgau
UniFilterplatten	Perkin-Elmer, Rodgau
Zellkulturflaschen und -pipetten	Costar, Cambridge, USA
Zentrifugenröhrchen	Falcon, Heidelberg

### 3.3 Chemikalien, Reagenzien und Kits

Chemikalie, Reagenz oder Kit	Firma, Ort
[Methyl <sup>3</sup> H] Thymidin (1mCi/ml)	Amersham, Braunschweig
5 % AB-Serum	Rotes Kreuz
BD Cytofix/Cytoperm™ Plus/Fixation/ Permeabilization Kit	BD, Heidelberg
dNTPs	NEB, Frankfurt
Dulbecco`s PBS	PAA, Pasching, Österreich
DuoSet ELISA	R&D Systems, Wiesbaden
Ficoll 400 1 %	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Flagellin (100 µg/ml)	Invitrogen, Karlsruhe
Fetales Kälberserum	PAA, Pasching, Österreich
FoxP3 Staining Buffer Set	eBioscience, Frankfurt
GM-CSF (255 U/ml)	Berlex, Leverkusen
IgG (50 mg/ml)	Biotest AG, Dreieich
IL-4 (144 U/ml)	Promokine, Heidelberg
L-Glutamin	Biochrom AG, Berlin

Lipopolysaccharid (100 µg/ml)	Alexis, Farmingdale, USA
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Eggenstein
QuantiFast SYBR-Green	Qiagen, Hilden
Random-Decamer-Primer	Ambion, Darmstadt
reverse Transkriptase M-MLV	Promega, Mannheim
RNeasy Mini-Kit	Qiagen, Hilden
RPMI 1640	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Szintillationslösung	Perkin Elmer, Rodgau

Alle weiteren Chemikalien, die in obiger Tabelle nicht aufgeführt sind, wurden von den Firmen Sigma-Aldrich (Deisenhofen) oder Merck (Darmstadt) bezogen. Für alle Lösungen, Puffer und Reaktionsansätze wurde grundsätzlich nur Millipore-gereinigtes Wasser oder RNase-freies Diethylpyrocarbonat (DEPC)-behandeltes H<sub>2</sub>O (H<sub>2</sub>O<sub>USB</sub>; Firma Amersham, Braunschweig) verwendet.

### 3.4 Medien, Puffer und Lösungen

FACS-Waschpuffer: PBS, 50 mg/ml IgG, 5 ml 10 %-iges Na-Azid

MOPS-Puffer (20x): 0,4 M (42 g) MOPS/NaOH (pH 7,0)  
100mM (4,1 g) Natriumacetat, 20mM (3,7 g) EDTA  
ad 500 ml H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub>

RNA-Ladepuffer: 50 % (10 ml) Formamid, deionisiert  
2,2 M (3,5 ml) Formaldehyd (37 %), 1x (1 ml) MOPS (20x)  
0,04 % (0,8 ml) Bromphenolblau (1 % in H<sub>2</sub>O)  
1 % (0,2 g) Ficoll  
ad 20 ml H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub>  
5 µl/ml Ethidiumbromid (10 mg/ml) vor Gebrauch zugeben.

### 3.5 Antikörper

Für den Nachweis von Oberflächen- oder intrazellulären Markern wurden folgende direkt mit Fluorochromen konjugierte monoklonale Antikörper gegen humane Antigene verwendet:

Spezifität	Isotyp	Klon	Spezies	Konjugat	Firma
CD14	IgG <sub>2b</sub>	My4	Maus	FITC	Beckman Coulter, Krefeld
CD1a	IgG <sub>1</sub>	T6	Maus	PE	Beckman Coulter, Krefeld
CD25	IgG <sub>1</sub>	2A3	Maus	APC	BD, Heidelberg
CD3	IgG <sub>1</sub>	UCHT1	Maus	APC	BD, Heidelberg
CD4	IgG <sub>1</sub>	RPA-T4	Maus	V450	BD, Heidelberg

CD8	IgG <sub>1</sub>	SK1	Maus	PE/Cy7	BioLegend, Fell
CD80	IgM	BB1	Maus	FITC	BD, Heidelberg
CD83	IgG <sub>2b</sub>	HB15a	Maus	FITC	Immunotech, Marseille
CD86	IgG <sub>1</sub>	2331 (FUN-1)	Maus	FITC	BD, Heidelberg
CD95	IgG <sub>1</sub>	DX-2	Maus	FITC	BD, Heidelberg
CD95L	IgG <sub>1</sub>	NOK-1	Maus	PE	eBioscience, Frankfurt
FoxP3	IgG <sub>2a</sub>	PCH101	Ratte	PE	eBioscience, Frankfurt
HLA-DR	IgG <sub>2b</sub>	B8.12.2	Maus	FITC	Immunotech, Marseille
IFN- $\gamma$	IgG <sub>1</sub>	B27	Maus	FITC	BD, Heidelberg
IL-17	IgG <sub>1</sub>	eBio64DEC17	Maus	Alexa Fluor 647	eBioscience, Frankfurt
IL-2	IgG <sub>2a</sub>	MQ1-17H12	Ratte	PE	BD, Heidelberg
IL-4	IgG <sub>1</sub>	8D4-8	Maus	Alexa Fluor 488	eBioscience, Frankfurt
PD-L1	IgG <sub>1</sub>	MIH1	Maus	PE	eBioscience, Frankfurt
$\beta_2$ M	IgG <sub>2a</sub>	$\beta_2$ M-01	Maus	FITC	Acris, Herfort

Für die Kontrollfärbungen wurden folgende Fluoreszenz-konjugierte Isotyp-Antikörper verwendet:

Isotyp	Klon	Spezies	Konjugat	Firma
IgG <sub>1</sub>	X40	Maus	PE	BD, Heidelberg
IgG <sub>Gesamt</sub>	MS- IgG	Maus	FITC	Beckman Coulter, Krefeld
IgM	GC323	Maus	FITC	Immunotech, Marseille
IgG <sub>2a</sub>	eBR2a	Ratte	FITC	eBioscience, Frankfurt

### 3.6 Oligonukleotide

Unmodifizierte, mittels HPLC aufgereinigte Oligonukleotide für die „real-time quantitative PCR“ (RT-qPCR) wurden entsprechend Kapitel 4.3.3.2.1 entworfen und von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) bezogen.

Gen		Sequenz: 5' → 3'
18S rRNA	Sense	ACCGATTGGATGGTTTAGTGAG
	Antisense	CCTACGGAAACCTTGTTACGAC

<i>AHR</i>	Sense	CTTCATATGTCGTCTAAGGTGTCTGCTG
	Antisense	GGTGGAAGTATTGATCCATCTTTCCC
<i>ALDH1A1</i>	Sense	GGCTTATCAGCAGGAGTGTTTACCA
	Antisense	GCACTTACCACGCCATAGCA
<i>ALDH1A2</i>	Sense	CAATGCAAGCTGGGACTGTTTGG
	Antisense	CTTTACTGTCACCGTCTTAACTTCTGAG
<i>ALDH1A3</i>	Sense	GAGCGAATAGCACCGACTATGGAC
	Antisense	TAAAGCCACCAAATGGAGCCTG
<i>ATG16L1</i>	Sense	CAGGGTTAAGCTTTGGGAAGTATTTGG
	Antisense	GTGCCGTAATCGATAATCATCCACAG
<i>CYP27B1</i>	Sense	TGGCAGAGCTTGAATTGCAAATGG
	Antisense	ACTGTAGGTTGATGCTCCTTTACAGG
<i>IDO1</i>	Sense	GGTCATGGAGATGTCCGTAAGGT
	Antisense	CCAGTTTCTTGGAGAGTTGGCAG
<i>IDO2</i>	Sense	GCATTCGTCATAGCAAGGAAAGTGG
	Antisense	CTGTCAGCAAGTGGTCCTGTC
<i>NALP3</i>	Sense	GGCTGTAACATTCCGAGATTGTGG
	Antisense	AGGGCGTTGTCACTCAGGTC
<i>NOD2</i>	Sense	TCCTGAAGTTGTCCAATAACTGCATCAC
	Antisense	AGCCGAGCTTGTCAACCTCC
<i>TLR4</i>	Sense	CCCTTCTCAACCAAGAACCTGGAC
	Antisense	CCCATCTTCAATTGTCTGGATTTACAC
<i>TLR5</i>	Sense	AGCATCCAGGGAAGATGTCCG
	Antisense	CCTGGTTGTTTAAAGACTTCAGTTCCT

### 3.7 Datenbanken und Software

CellQuestPro	BD, Heidelberg
Corel Draw X3	Universität Regensburg
Ensembl Genome Browser	<a href="http://www.ensembl.org">www.ensembl.org</a>
Gene ontology	<a href="http://www.geneontology.org">www.geneontology.org</a>
Microsoft Office 2003, 2007 und 2010	Microsoft Redmond, USA
Perlprimer Version 1.1.19	<a href="http://perlprimer.sourceforge.net/">http://perlprimer.sourceforge.net/</a>
PubMed	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez">www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez</a>
SensorDish-Reader-Software	PreSens, Regensburg
SPSS 18	Universität Regensburg
UCSC Genome-Browser (BLAT, <i>in silico</i> -PCR)	<a href="http://www.genome.ucsc.edu">www.genome.ucsc.edu</a>

## 4 Methoden

### 4.1 Zellbiologische Methoden

Soweit nicht anders erwähnt, wurden alle Zellen zum Waschen und Ernten für 8 Minuten bei 300 x g und 4° C zentrifugiert.

#### 4.1.1 Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung

Falls nicht anderweitig beschrieben, erfolgte die Bestimmung der Zellzahl und Vitalität der kultivierten Zellen mittels einer Neubauer-Zählkammer im Trypanblau-Ausschlusstest. Hierzu verdünnte man die Zellsuspension im 1:1-Verhältnis mit 0,2 % Trypanblaulösung. Die Vitalitätsbestimmung erfolgte anhand der Unterscheidung der Zellen durch ihre unterschiedliche Anfärbung. Aufgrund ihrer porösen Zellmembran lagern tote Zellen Trypanblau ein und erscheinen im Lichtmikroskop im Gegensatz zu den ungefärbten lebenden Zellen blau.

Die Zellzahl wurde mit Hilfe der Auszählung mehrerer Großquadrate (16 Kleinquadrate pro Großquadrat) im Phasenkontrastmikroskop nach folgender Gleichung berechnet:

$$n \text{ (Zellen/ml)} = N \times V \times 10^4$$

n = Zellzahl

N = Mittelwert der ungefärbten oder gefärbten Zellen pro Großquadrat

V = Verdünnungsfaktor

benötigte Lösungen:

Trypanblaulösung:	0,2 % (w/v) (0,2 g)	Trypanblau
	ad 100 ml	NaCl-Lösung (0,9 %)

#### 4.1.2 Gewinnung humaner Monozyten

Zur Gewinnung humaner Monozyten wurden gesunden Spendern durch Leukapherese Leukozyten entnommen [276]. Mit Hilfe einer nachfolgenden Dichtegradienten-Zentrifugation über Ficoll/Hypaque (PAN Biotech, Aidenbach) wurden mononukleäre Zellen (MNC, *mononuclear cell*) von den restlichen Leukozyten isoliert und dreimal mit PBS (PAA Laboratories, Pasching, Österreich) gewaschen [277].

Die darauffolgende Monozytenisolierung erfolgte über Gegenstromzentrifugation (Elutriation) innerhalb einer 50 ml-Trennkammer in einer Beckmann-Zentrifuge (J6M-E) bei 2.500 Upm und 4° C [278].

Vor Gebrauch wurden die Apparatur und die damit verbundenen Schläuche 20 Minuten mit 6 %-iger Wasserstoffperoxid-Lösung sterilisiert, mit PBS gespült und von Luftblasen befreit. Nach Eichung des Geräts bei 600 x g und 4° C mit Hanks BSS (PAA Laboratories, Pasching, Österreich) wurden die MNCs bei einer Flussrate von 52 ml pro Minute in das System ge-



pumpt. Bei konstantem Zulauf von Hanks mit 6 %-igem autologem Plasma wurde die Durchflußrate schrittweise gesteigert und die unten beschriebenen Fraktionen gesammelt (siehe Tabelle 4.1).

**Tabelle 4.1: Elutriationsparameter und damit verbundene Zelltypen**

Fraktion	Volumen (ml)	Durchflußrate (ml/min)	vorwiegend enthaltener Zelltyp
Ia	1.000	52	Thrombozyten
Ib	1.000	57	
IIa	1.000	64	B- und T-Lymphozyten, natürliche Killer-Zellen
IIb	500	72	
IIc	400	82	
IId	400	92	
III	800	111	Monozyten

Die Monozyten wurden abzentrifugiert, in RPMI 1640 resuspendiert und gezählt. Die Ausbeute an Monozyten bezogen auf die eingesetzten MNCs lag je nach Spender zwischen 10 und 20 %.

Die Reinheit der erhaltenen Monozyten betrug  $\geq 85$  %, was sowohl mikroskopisch, als auch durch die Analyse der CD14-, CD3- und CD20-Oberflächenexpression mittels Durchflusssyztometrie überprüft wurde.

Um sicherzustellen, dass unstimulierte Monozyten eingesetzt wurden, erfolgte die routinemäßige Kontrolle des Stimulierungsgrad der Zellen durch die Bestimmung der IL-6-Konzentration in den Zellkulturüberständen ( $1 \times 10^6$  Monozyten/2 ml RPMI 1640, 2 % humanes AB-Serum) nach Übernachtinkubation.

#### 4.1.3 Generierung von dendritischen Zellen aus primären Monozyten

Je  $20 \times 10^6$  der isolierten Monozyten wurden in 30 ml RPMI 1640 mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS, *fetal calf serum*) unter Zugabe der Zytokine IL-4 (144 U/ml) und GM-CSF (225 U/ml) für sieben Tage bei 37° C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit in mittleren Zellkulturflaschen (75 cm<sup>2</sup>) zu unreifen dendritischen Zellen (iDC, *immature DC*) differenziert. Dem Medium wurden 2 mmol/l L-Glutamin (Biochrom, Berlin), 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin (beide Gibco, Darmstadt) zugesetzt.

Zur Analyse des Einflusses unterschiedlicher bakterieller Stimuli auf die DCs, wurden diese an Tag sieben für zwei weitere Tage mit Lipopolysaccharid (LPS) (10 ng/ml, aus *Salmonella abortus equi*; Alexis, Grünberg), Flagellin (100 ng/ml, aus *Salmonella typhimurium*; Invitrogen, Toulouse, Frankreich) und Muramyldipeptid (MDP) (100 ng/ml, aus *Staphylococcus aureus*; Sigma, Deisenhofen) - einzeln oder in bestimmten Kombinationen inkubiert und so reife dendritischen Zellen (mDC, *mature DC*) generiert.

#### 4.1.4 Gewinnung dendritischer Zellen und deren Überstände

An Tag neun wurden die DCs inklusive Medium in 50 ml-Reaktionsgefäße überführt und gewaschen. Ein Volumen von ca. 1,5 ml des Überstandes wurde für die Zytokinmessung mittels ELISA steril filtriert, bei -20° C gelagert und der Rest verworfen.

Die Resuspendierung der Zellpellets erfolgte in 5 % AB-Serum mit darauffolgender Zellzählung. Die für die Genexpressions- und durchflusszytometrische Analyse benötigten Zellvolumina wurden abgenommen und die verbleibende Zellsuspension für die gemischte Leukozytenreaktion (MLR, *mixed leucocyte reaction*) verwendet.

## 4.2 Immunologische Methoden

### 4.2.1 Gemischte Leukozytenreaktion (MLR)

In der MLR wurden reife DCs als Stimulatorzellen mit allogenen naiven T-Zellen der Fraktion IIa als Effektorzellen kokultiviert (siehe Tabelle 4.1). Zur Quantifizierung der Proliferation der T-Lymphozyten wurde die Radioaktivität von inkorporiertem radioaktiv markierten [<sup>3</sup>H]-Thymidin bestimmt, welches von proliferierenden Zellen in deren DNA eingebaut wird.

Die DCs wurden in unterschiedlichen Konzentrationen (1:2-Verdünnungsreihe mit Anfangsmenge von  $2 \times 10^4$  bis zur Endkonzentration von  $6,25 \times 10^2$  DCs) in 96-Well-Platten pipettiert und mit allogenen T-Lymphozyten als Responderzellen in konstanter Konzentration von  $1 \times 10^5$  pro Well bei einem Endvolumen von 200 µl pro Well kokultiviert. Die jeweiligen Kontrollen der DCs sowie der T-Zellen wurden mit je 100 µl RPMI 1640 inklusive 5 % AB-Pool angesetzt.

Zur optimalen Interaktion der Zellen wurden die Platten anschließend abzentrifugiert. Nach einer Inkubationszeit von fünf Tagen bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub>, wurde zur Quantifizierung der Responderproliferation [<sup>3</sup>H]-Thymidin in einer Dosis von 0,5 mCi pro Well hinzugegeben.

Nach weiteren 18 h Inkubation wurden die Komplexe mit einem Wallac-Erntegerät (Perkin Elmer, Gaithersburg, MD) auf 96-Well-UniFilter-Platten übertragen, anschließend mit 50 µl Szintillationslösung überschichtet und die Oberseiten mit TopSeal-A-Folien (beide Perkin Elmer, Gaithersburg, MD) verschlossen. Die Messung der [<sup>3</sup>H]-Inkorporationsrate erfolgte am Wallac Betaplate-Zähler (Perkin Elmer, Gaithersburg, MD) in „Zähler pro Minute“ (cpm, *counts per minute*).

Diese Experimente wurden freundlicherweise mit Unterstützung von Alice Peuker aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Marina Kreutz, Universitätsklinikum Regensburg durchgeführt.

### 4.2.2 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie dient der Detektion von zellgebundenen Fluoreszenz-markierten Antikörpern und liefert somit Informationen über den Phänotyp einer Zelle. Dabei passieren einzelne Zellen innerhalb eines Flüssigkeitsstroms einen fokussierten Laserstrahl. Es wird sowohl die Fluoreszenz der durch den Laserstrahl angeregten Farbstoffe, als auch die Licht-

streuung durch die Zellen selbst detektiert. Anhand der Richtung des Streulichts lassen sich einerseits Rückschlüsse auf die Größe (Vorwärts-Streulicht) und andererseits auf die Granularität der Zellen (Seitwärts-Streulicht) schließen.

Die verwendeten Geräte (FACS Calibur und LSR II, BD, Heidelberg) verfügten über zwei bzw. vier Laser und ermöglichten die Messung von insgesamt sechs bzw. zehn Parametern pro Zelle. Als Farbstoffkonjugate wurden FITC (Fluorothioisocyanat), PE (Phycoerythrin), PE-Cy7, Horizon V450, Alexa Fluor 488 bzw. 647 und APC (Allophycocyanin) verwendet.

#### **4.2.2.1 Oberflächenantigenfärbung**

Die zu untersuchende Zellsuspension wurde, wie in 4.1.4 beschrieben, in FACS-Röhrchen (Falcon/BD, Franklin Lakes, USA) überführt, in ca. 2-3 ml FACS-Waschpuffer gelöst und gewaschen. Nach Abzentrifugieren (520 x g, 4° C, 4 min) wurden für je eine Färbung  $0,5 \times 10^6$  Zellen in 50 µl FACS-Waschpuffer resuspendiert und die vom Hersteller angegebene Menge an Antikörper hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 4° C folgten zwei weitere Waschschriffe mit 600 µl FACS-Waschpuffer und die Zentrifugation bei 520 x g, 4°C, 4 min. Zuletzt erfolgte die Fixierung der gefärbten Zellen mittels 300-400 µl 1 %-igem PFA (1g Paraformaldehyd in 100 ml PBS) und die durchflusszytometrische Analyse.

#### **4.2.2.2 Intrazellulärfärbung**

Hierzu wurden die ausdifferenzierten DCs in den Konzentrationen 2.500 und 10.000 Zellen pro Ansatz, mit allogenen T-Zellen in konstanter Konzentration von 100.000 Zellen pro Ansatz, bei einem Endvolumen von 200 µl unter sterilen Bedingungen in 96-Well-Platten kultiviert. Die MLRs wurden im Anschluss daran für fünf Tage bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Es erfolgte die intrazelluläre Färbung und Messung der Zytokine (IL-2, IL-4, IFN-γ und IL-17) und des Transkriptionsfaktors FoxP3 (*forkhead BoxProtein 3*) am Durchflusszytometer LSR II (BD, Heidelberg).

##### **4.2.2.2.1 Färbung der Zytokine IL-2, IL-4, IFN-γ und IL-17**

Nach fünfstündiger Stimulation der Zellen mit Phorbolmyristatacetat (PMA, 20 ng/ml, Calbiochem GmbH, Bad Soden), Ionomycin (1 µM, Alexis, Grünberg) und der Zugabe von Golgi-Stop (BD, Heidelberg), wurden diese geerntet und mit FACS-Waschpuffer gewaschen. Um die T-Zell-Fraktion durchflusszytometrisch abgrenzen zu können, führte man eine direkte Antikörperfärbung der typischen T-Zell-Oberflächenantigene CD3, CD4, CD8 und des Aktivitätsmarkers CD25 nach oben beschriebener Verfahrensweise (siehe 4.2.2.1) durch. Nach einem darauffolgenden Waschschriffe wurden die Zellen mit 250 µl einer Fixierungs- und Permeabilisierungs-Lösung (BD, Heidelberg) für 20 min bei 4° C fixiert und für die intrazelluläre Antikörperaufnahme vorbereitet. Nach zweimaligem Waschen der permeabilisierten Zellen mit BD Perm/Wash (BD, Heidelberg) erfolgte die Intrazellulärfärbung mit der vom Hersteller angegebenen Antikörpermenge (IL-2, IL-4, IFN γ und IL-17). Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 4° C und weiterem zweimaligem Waschen mit BD Perm/Wash wurden die

Zellen in PBS aufgenommen und am LSR II analysiert. Die Färbung und Analyse wurden freundlicherweise von Rüdiger Eder aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Matthias Edinger und PD Dr. Petra Hoffmann, Universitätsklinikum Regensburg durchgeführt.

#### **4.2.2.2 Färbung des Transkriptionsfaktors FoxP3**

Die Detektion des Transkriptionsfaktors FoxP3 verläuft ähnlich wie die intrazelluläre Zytokin-färbung. Im Gegensatz dazu, wurden die Zellen nicht vorstimuliert, die Schritte der direkten Antikörperfärbung der Oberflächenmoleküle CD3, CD4, CD8 und CD25 erfolgten jedoch wie in 4.2.2.1 beschrieben. Im Anschluss daran wurden die Zellen mit 1 ml der Fixations-/Permeabilitäts-Lösung (eBioscience, Frankfurt) fixiert und anschließend für 45 min bei 4° C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit 2 ml Permeabilisierungspuffer (eBioscience, Frankfurt) erfolgte die Zugabe des Antikörpers FoxP3. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 4° C und weiterem zweimaligem Waschen mit Permeabilitätspuffer wurden die Zellen in PBS aufgenommen und am LSR II analysiert. Die Färbung und Analyse wurde ebenfalls freundlicherweise von Rüdiger Eder aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Matthias Edinger und PD Dr. Petra Hoffmann, Universitätsklinikum Regensburg durchgeführt.

### **4.2.3 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)**

Zur Bestimmung von Zytokinen in den Kulturüberständen der dendritischen Zellen (Gewinnung siehe 4.1.4) wurden kommerziell erhältliche ELISA verwendet. Dabei bindet das zu analysierende Antigen den sogenannten Coating-Antikörper, der mit einer festen Oberfläche (z.B. Mikrotiterplatte) verbunden ist. Der Detektionsantikörper, der daraufhin das gesuchte Antigen spezifisch bindet, ist mit einem Marker, hier mit einem Enzym, gekoppelt, welches bei Umsetzung eines zugegebenen Substrats einen Farbstoff entstehen lässt. Die Stärke der entstehenden Färbung lässt Rückschlüsse auf die Konzentration des gesuchten Antigens zu [279]. Die Analyse der zu untersuchenden Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-23 und TNF erfolgte mittels „DuoSet ELISA“ nach Angaben des Herstellers (R&D Systems, Wiesbaden). Die Messungen wurden freundlicherweise mit Unterstützung von Alice Peuker aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Marina Kreutz, Universitätsklinikum Regensburg durchgeführt.

## **4.3 Molekularbiologische Methoden**

### **4.3.1 Isolation von RNA aus dendritischen Zellen**

Um eine Genexpressionsanalyse durchführen zu können, musste zunächst die RNA aus den Zellen gewonnen werden. Nach Abnahme der Kulturüberstände (siehe 4.1.4), wurden die gewonnenen Zellen nach zweimaligem Waschen mit PBS mit 350  $\mu$ l RLT-Puffer (RNeasy® Mini Kit, Qiagen, Hilden) und 2 %  $\beta$ -Mercaptoethanol versetzt, durch eine Spritze mit gelber Kanüle (20G) gezogen und somit lysiert. Die Isolierung der RNA erfolgte nach Angaben des Herstellers mit dem „RNeasy® Mini Kit“ (Qiagen, Hilden). Die Konzentration der isolierten RNA wurde photometrisch mit Hilfe des Spektralphotometers NanoDrop ND1000 (PeqLab,

Erlangen) bestimmt. Die Qualitätsprüfung der RNA wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe 4.3.2) durchgeführt. Die isolierte RNA wurde entweder direkt zu cDNA (*copy DNA*) umgeschrieben oder bis zur reversen Transkription (siehe 4.3.3.1) bei -20° C gelagert.

### 4.3.2 Agarose-Gelelektrophorese

Das Lösen der Agarose erfolgte in den entsprechenden Mengen von H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> und MOPS (3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure)-Puffer (20x) laut Tabelle 4.2 durch Erhitzen in einer Mikrowelle. Unter dem Abzug wurde nach Abkühlen der Lösung auf ca. 60° C unter Rühren Formaldehyd hinzugefügt und das Gel in die vorbereitete Form überführt.

**Tabelle 4.2: Zusammensetzung von RNA-Agarosegelen**

Agarose	H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub>	MOPS (20x)	Formaldehyd	Endvolumen
0,3 g	22,8 ml	1,5 ml	5,3 ml	30 ml
0,5 g	38 ml	2,5 ml	8,8 ml	50 ml
1,5 g	115 ml	7,5 ml	26,5 ml	150 ml
2,5 g	190 ml	12,5 ml	44 ml	250 ml

Nach Verdünnen der RNA-Proben im Verhältnis 1:4 mit RNA-Ladepuffer, wurden diese 20 Minuten bei 65° C denaturiert, auf Eis gestellt, kurz abzentrifugiert und in die mit 1x MOPS-Ladepuffer beschichteten Probestaschen überführt. Durch Vorinkubation der Proben für 1 Stunde bei 37° C ist es möglich, durch die Aktivierung von RNAsen, eine Kontamination der zu untersuchenden RNA sichtbar zu machen. Aus diesem Grund wurden die Proben mit und ohne Inkubation analysiert. Im Anschluss erfolgte die elektrophoretische Auftrennung bei 40 V für 4-6 h.

### 4.3.3 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) dient der *in vitro*-Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente. Hierzu werden eine DNA-Vorlage (*template*), eine hitzestabile DNA-Polymerase und sequenzspezifische Oligonukleotid-Primer benötigt, die den zu vervielfältigenden DNA-Bereich flankieren [280].

Zur Quantifizierung der Expressionsstärke von Genen besteht die Möglichkeit, eine spezielle Form der PCR, die „real-time quantitative PCR“ (RT-qPCR), anzuwenden, wie es in dieser Arbeit gemacht wurde. Um diese Methode durchführen zu können, muss die gewonnene RNA zunächst in komplementäre DNA (cDNA, *copy DNA*) durch reverse Transkription (RT, siehe 4.3.3.1) umgeschrieben werden, da eine Amplifikation der RNA durch die eingesetzten DNA-Polymerasen nicht möglich ist.

#### 4.3.3.1 Reverse Transkription

Die Transkription der isolierten Gesamt-RNA in cDNA erfolgte mit Hilfe der Reversen Transkriptase aus einem murinen Leukämie-Virus (Stamm Moloney) (M-MLV), Dekanukleotid-Primern mit zufälliger Sequenz („Random-Decamer“-Primer) und 2-Desoxy-ribonukleosid-5'-Triphosphaten (dNTPs). Die Reaktion mit einem Gesamtvolumen von 20 µl wurde in dickwandigen Reaktionsgefäßen angesetzt und in einem PCR-Thermocycler inkubiert.

<u>RT-Reaktion:</u>	0,5 µg	Gesamt-RNA
	1 µl	„Random-Decamer“-Primer
	1 µl	dNTPs (je 10 µM)
	ad 15 µl	H <sub>2</sub> O <sub>USB</sub>
	5 min bei 65° C inkubieren, auf Eis stellen, abzentrifugieren.	
	4 µl	M-MLV-Puffer (5x)
	2 min bei 42° C inkubieren.	
	1 µl	M-MLV Reserve Transkriptase
	50 min bei 42° C, anschließend 15 min bei 70° C inkubieren.	

#### 4.3.3.2 „Real-time“ quantitative PCR (RT-qPCR)

Nach Transkription der zu untersuchenden RNA in cDNA (siehe 4.3.3.1), erfolgte im Anschluss die Amplifikation der DNA mittels RT-qPCR. Die auf dem Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion basierende RT-qPCR verwendet einen Farbstoff (z.B. „SYBR-Green“), der sich in doppelsträngige DNA einlagert und in gebundener Form fluoresziert. Die Menge an Fluoreszenz, die nach jedem PCR-Zyklus vom PCR-Gerät registriert und bestimmt wird, ist zur Menge amplifizierter DNA proportional. Die Quantifizierung der PCR-Produkte erfolgt in der frühen und zugleich exponentiellen Phase der PCR: ein sogenannter „cycle threshold“ (ct)-Wert, welcher den PCR-Zyklus beschreibt, in dem die Fluoreszenz in einer Probe erstmalig signifikant den Wert der Hintergrundfluoreszenz übersteigt, wurde für jede gemessene Probe vom PCR-Gerät bestimmt. Mit Hilfe der Standardgeraden, welche durch Amplifikation bekannter cDNA-Mengen und den daraus ermittelten ct-Werten erstellt wurde, konnte dem ct-Wert der Proben eine relative cDNA-Menge zugeordnet werden.

##### 4.3.3.2.1 Entwerfen von Primern für die RT-qPCR

Die genomischen DNA-Sequenzen für das Entwerfen von RT-qPCR-Primern wurden aus der Datenbank „Ensembl Genome Browser“ bezogen. Die Primer wurden mit der Software „Perlprimer“ freundlicherweise von Dr. Michael Kastenberger und Dr. Katrin Peter konstruiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Oligonukleotidsequenzen einen GC-Gehalt von ca. 40-60 % enthielten.

Für die Primer galten folgende Kriterien:

Schmelztemperatur: 65-68° C

Länge: 18-28 bp

Länge des Amplifikats: 70-200 bp

Um die Amplifikation genomischer DNA zu verhindern, wurden RT-qPCR-Primer auf zwei verschiedene, ein Intron begrenzende, Exons gelegt. Zur Vermeidung der Vervielfachung unspezifischer Nebenprodukte, wurde die Spezifität der Primer mittels „BLAT“ und „*in silico*-PCR“ (beide auf den Seiten des „UCSC Genome Browsers“) kontrolliert.

#### 4.3.3.2.2 Reaktionsansatz von RT-qPCR-Reaktionen

Zur Durchführung der RT-qPCR wurde der „QuantiFast SYBR Green-Kit“ verwendet.

Die Reaktionen wurden in PCR-Platten mit 96 Vertiefungen in einem Volumen von 10 µl angesetzt. Die verwendete cDNA wurde 1:5 bzw. 1:10 in H<sub>2</sub>O<sub>USB</sub> verdünnt.

Der Reaktionsansatz setzte sich aus 5 µl QuantiFast SYBR Green-Mischung, 0,5 µl Sense-Primer (10 µM), 0,5 µl Antisense-Primer (10 µM), 1 bzw. 2 µl cDNA und 2 bzw. 3 µl H<sub>2</sub>O<sub>USB</sub> zusammen. Nach Verschweißen der Platte mit einer Siegelfolie und kurzer Zentrifugation, wurde die RT-qPCR am Realplex Mastercycler EpGradient S (Eppendorf, Hamburg) nach dem in Tabelle 4.3 beschriebenen Programm durchgeführt.

**Tabelle 4.3: Standardprogramm für die RT-qPCR**

PCR-Schritt		Parameter
Initiales Aufschmelzen		95° C, 5 min
45 Zyklen	Aufschmelzen	95° C, 8 s
	Hybridisierung, Elongation	60° C, 20 s
Schmelzkurve		95° C, 15 s
		65° C, 15 s
		65-95° C, 10 min

Zur Bildung der Standardgeraden setzte man bei jeder RT-qPCR-Messung neben den zu analysierenden Proben zusätzlich eine Verdünnungsreihe (unverdünnt, 1:10, 1:50, 1:100, 1:500, 1:1000) mit einer für das zu untersuchende Gen positiven Probe ein.

Mittels der Steigung der Standardgeraden (*slope*) und des Schnittpunktes der Standardgeraden mit dem y-Achsenabschnitt (*y-Intercept*), berechnete die Realplex-Software die relative Menge an cDNA in den analysierten Proben.

Die spezifische Amplifikation des gewünschten PCR-Produktes wurde anhand des Verlaufs der Schmelzkurve kontrolliert. Alle Proben wurden in Triplikaten gemessen. Die erhaltenen Daten wurden in „Microsoft Excel 2003“ importiert und auf die jeweilige Menge von 18S rRNA, welche ebenfalls mittels RT-qPCR ermittelt wurde, normalisiert.

#### 4.4 Statistische Auswertung

Die erhaltenen Messwerte wurden gemittelt, außerdem wurde die Standardabweichung (SD, *standard deviation*) errechnet. Signifikanzen zwischen zwei verschiedenen Ansätzen wurden mit Hilfe der Software „SPSS 18“ unter Anwendung des ungepaarten Student's t-test bestimmt. Ein P-Wert von  $<0,05$  wurde als statistisch signifikant (\*),  $<0,01$  als sehr signifikant (\*\*) und  $<0,001$  als hoch signifikant (\*\*\*) betrachtet. P-Werte von  $>0,05$  galten als nicht signifikant (n.s.).



## 5 Ergebnisse

Da die Stimulation dendritischer Zellen (DC, *dendritic cell*) durch bakterielle Komponenten eine entscheidende Rolle in der Pathophysiologie der „Graft-versus-Host-Disease“ (GvHD) zu spielen scheint, stellte sich die Frage, inwiefern Lipopolysaccharid (LPS), Flagellin und Muramyl-dipeptid (MDP) die Eigenschaften von DCs beeinflussen.

Zur *in vitro*-Generierung von unreifen DCs (iDC, *immature DC*) wurden humane Monozyten für sieben Tage mit IL-4 und GM-CSF stimuliert [24]. Die so gewonnenen iDCs wurden für zwei weitere Tage mit LPS, Flagellin (Flag) und MDP sowie den Kombinationen aus LPS mit Flagellin, sowie LPS mit MDP inkubiert. Im Folgenden werden die DCs je nach ihrem zugeetzten Stimulus benannt: „LPS-DC“, „Flag-DC“, „MDP-DC“, „LPS+Flag-DC“ und „LPS+MDP-DC“. Am Tag neun erfolgte die Analyse der DCs.

### 5.1 Analyse der Expression von Oberflächenantigenen auf dendritischen Zellen nach Inkubation mit bakteriellen Komponenten

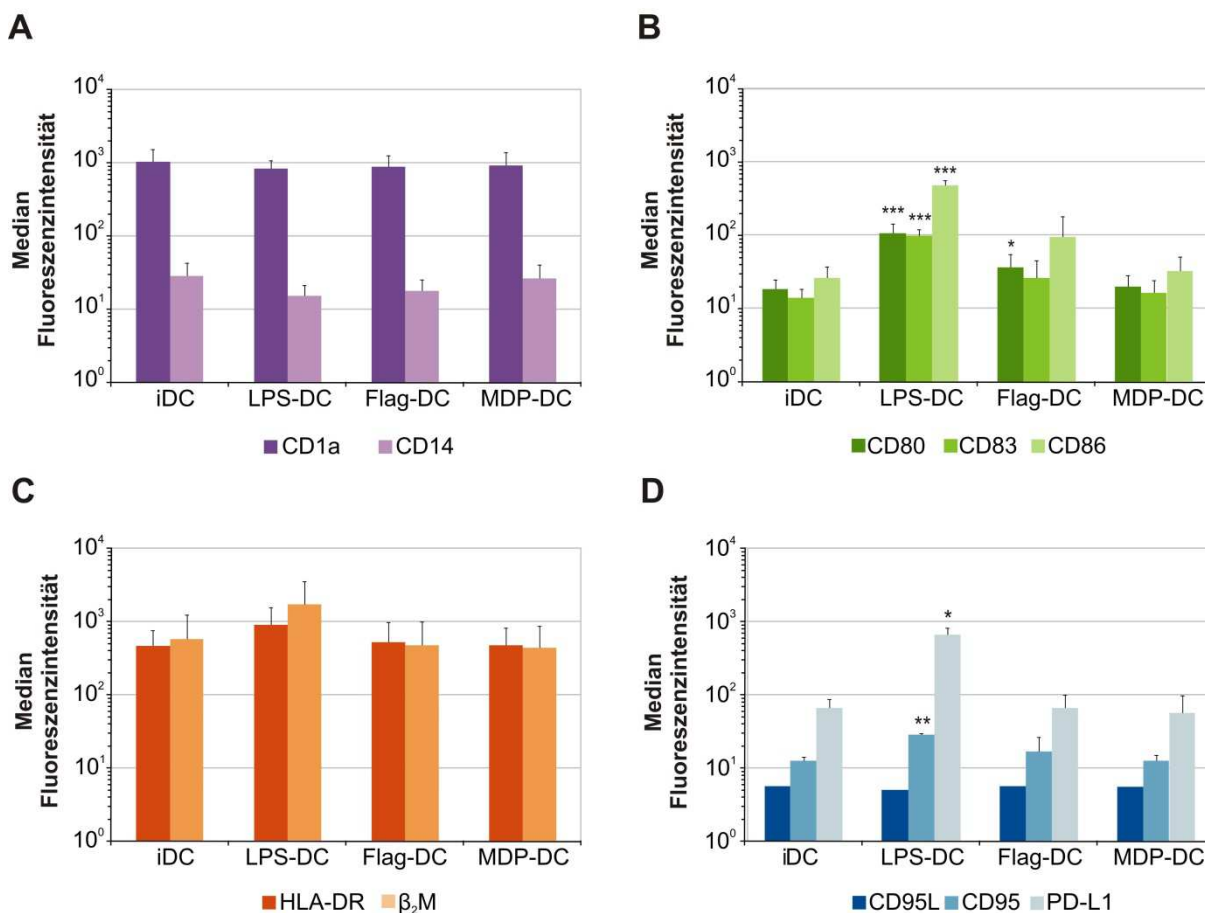
Zunächst sollte der Einfluss der bakteriellen Komponenten auf die Expression von Oberflächenantigenen auf DCs untersucht werden. Hierbei wurde die Expression der typischen DC-Marker CD1a und CD83, des Monozytenmarkers CD14, der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86, sowie die MHC-Moleküle HLA-DR (MHC-II) und  $\beta_2$ -Mikroglobulin ( $\beta_2$ M, MHC-I) durchflusszytometrisch analysiert [53]. Zudem wurde die Expression von CD95 (Fas) und seinem Ligand CD95L (FasL) als Induktoren der Apoptose sowie der „Programmed-cell-death-ligand-1“ (PD-L1) als koinhibitorisches Molekül von T-Zellen (siehe Kapitel 1.2.3) ermittelt.

#### 5.1.1 Einfluss von LPS, Flagellin und MDP auf die Expression von Oberflächenantigenen auf dendritischen Zellen

Zur Analyse der Oberflächenantigenexpression wurden die am Tag sieben geernteten DCs mit monoklonalen Antikörpern gegen CD1a und CD14, CD80, CD83 und CD86, HLA-DR und  $\beta_2$ M sowie CD95L, CD95 und PD-L1 angefärbt und die Antigenexpression mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestimmt.

Wie in Abbildung 5.1-A veranschaulicht, führte eine Stimulation der DCs mit LPS, Flagellin und MDP zu einer ähnlich hohen Expression des DC-Differenzierungsmarkers CD1a bei gleichzeitig verminderter Expression des Monozytenmarkers CD14. Dies trat allerdings auch ohne Stimulus auf und ist somit nicht reifungsassoziiert. Im Gegensatz dazu, stellte sich die Expression der Reifungsmarker CD80, CD83 und CD86 nach Inkubation mit LPS im Vergleich zur Kontrolle signifikant verstärkt dar. Zudem ließ sich eine signifikant erhöhte Expression von CD80 bei Inkubation der DCs mit Flagellin beobachten. MDP zeigte im Vergleich zum unstimulierten Status keinen Einfluss auf die Expression der DC-Reifungsmarker (Ab-

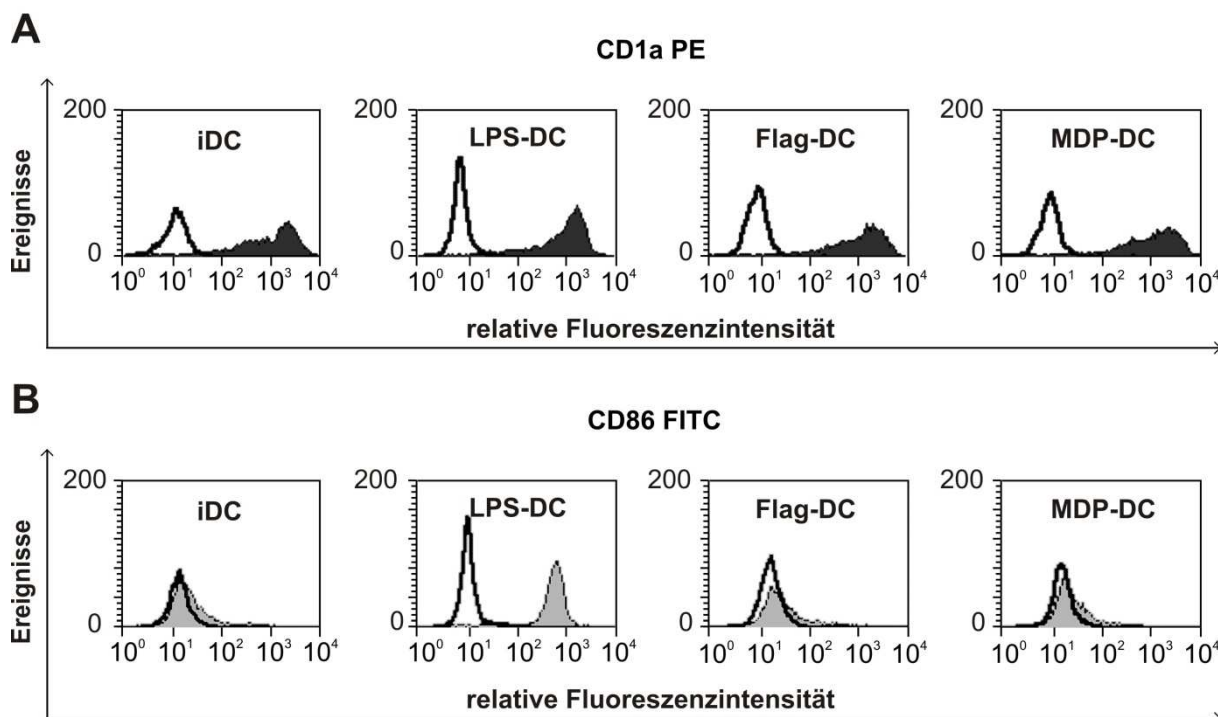
bildung 5.1-B). Bezüglich der Expression von HLA-DR und  $\beta_2$ M ließen sich, wie Abbildung 5.1-C zeigt, keine signifikanten Unterschiede durch die verschiedenen bakteriellen Stimuli im Vergleich zum unreifen Status feststellen, wobei bei LPS-DCs eine tendenziell stärkere Expression der beiden Moleküle beobachtet werden konnte. CD95 und PD-L1 wurden nach Inkubation mit LPS im Vergleich zum unstimulierten Zustand in signifikantem Maße verstärkt exprimiert, wohingegen Flagellin und MDP keinen Einfluss auf deren Expression hatten. Wie in Abbildung 5.1-D an einem Einzelexperiment gezeigt, beeinflusste keines der einzelnen Stimuli die Expression von CD-95L.



**Abbildung 5.1: Oberflächenantigenexpression auf dendritischen Zellen unter Einfluss von LPS, Flagellin und MDP**

Zur Generierung von unreifen DCs (iDC, *immature DC*) wurden humane Monozyten mit 10 % FCS, GM-CSF und IL-4 über sieben Tage kultiviert. Die gewonnenen iDCs wurden daraufhin für zwei weitere Tage mit 10 ng/ml LPS (LPS-DC), 100 ng/ml Flagellin (Flag-DC) oder 100 ng/ml MDP (MDP-DC) inkubiert. Am Tag neun erfolgte die direkte Oberflächenfärbung der geernteten Zellen mit monoklonalen Antikörpern gegen (A) CD1a und CD14, (B) CD80, CD83 und CD86, (C) HLA-DR und  $\beta_2$ M und (D) CD95L, CD95 und PD-L1. Als Kontrolle dienten iDCs. Die Antigenexpression wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert des Median der Fluoreszenzintensität aus mindestens fünf unabhängigen Experimenten  $\pm$  SD. Im Fall von CD95L ist ein Einzelexperiment dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mittels Student's t-test: \* $P$ <0,05, \*\* $P$ <0,01, \*\*\* $P$ <0,001 relativ zu iDCs.

Abbildung 5.2 zeigt Histogramme der Fluoreszenzintensität der Marker CD1a und CD86 eines repräsentativen Experimentes. Hier wird nochmals deutlich, dass nur LPS zu einer effektiven Induktion des Reifungsmarkers CD86 führt.



**Abbildung 5.2: Durchflusszytometrische Darstellung der Oberflächenantigenexpression von CD1a und CD86 auf dendritischen Zellen unter Einfluss von LPS, Flagellin und MDP**

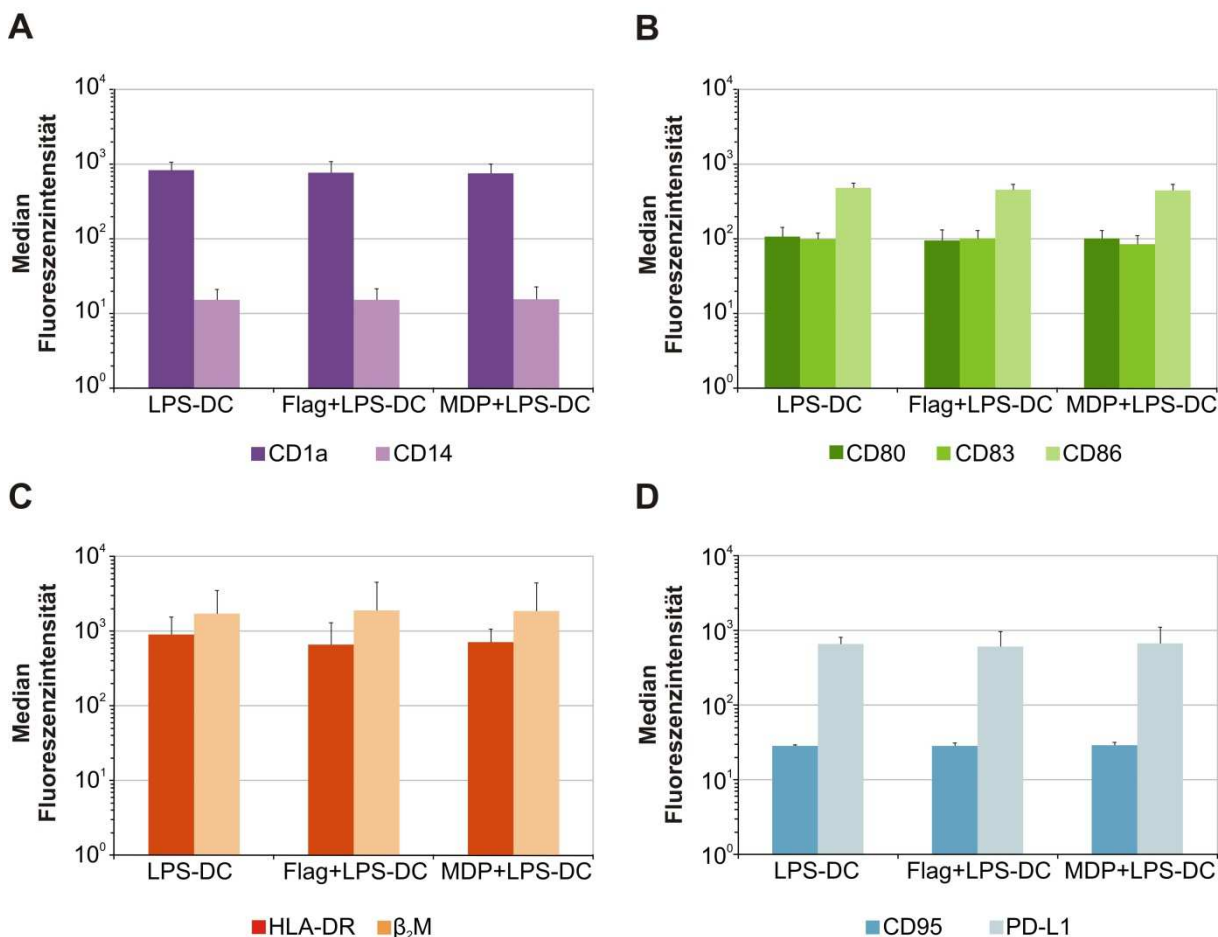
Zur Generierung von unreifen DCs (iDC, *immature DC*) wurden humane Monozyten mit 10 % FCS, GM-CSF und IL-4 über sieben Tage kultiviert. Die gewonnenen iDCs wurden daraufhin für zwei weitere Tage mit 10 ng/ml LPS (LPS-DC), 100 ng/ml Flagellin (Flag-DC) oder 100 ng/ml MDP (MDP-DC) inkubiert. Am Tag neun erfolgte die direkte Oberflächenfärbung der geernteten Zellen mit monoklonalen Antikörpern gegen (A) CD1a und (B) CD86. Als Kontrolle dienten iDCs. Die Antigenexpression wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Gezeigt ist jeweils die Population der Kontrolle und der stimulierten DCs (schwarze bzw. graue Kurven). Als Negativkontrollen dienten entsprechende Isotypenkontrollen (weiße Kurven). Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus fünf unabhängigen Experimenten.

### 5.1.2 Einfluss von LPS in Kombination mit Flagellin bzw. MDP auf die Expression von Oberflächenantigenen auf dendritischen Zellen

Unter physiologischen Bedingungen sind DCs, besonders im Rahmen der GvHD, nicht den einzelnen bakteriellen Bestandteilen alleine ausgesetzt, sondern werden vielmehr durch mehrere bakterielle Liganden parallel stimuliert. Daher stellte sich die Frage, wie sich die Kombination der Stimuli LPS, Flagellin und MDP auf die Oberflächenantigenexpression von DCs auswirkt. Hierzu wurden die DCs mit LPS in Kombination mit Flagellin bzw. MDP stimuliert, im Anschluss einer direkten Oberflächenantigenfärbung mit monoklonalen Antikörpern gegen CD1a und CD14, CD80, CD83 und CD86, HLA-DR und  $\beta_2$ M sowie CD95 und PD-L1 unterzogen und durchflusszytometrisch analysiert.

Abbildung 5.3 veranschaulicht, dass die kombinierte Inkubation mit LPS und Flagellin bzw. MDP im Vergleich zur alleinigen Inkubation mit LPS, eine ähnlich starke Expression sowohl

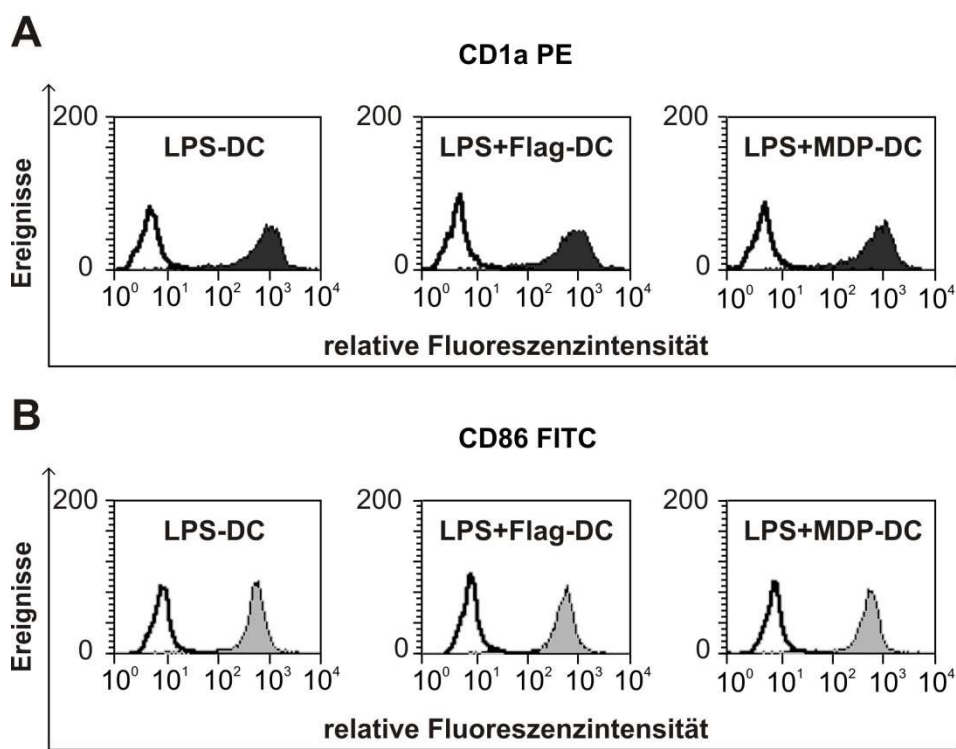
von CD1a und CD14 (Abbildung 5.3-A), als auch der Reifungsmarker CD80, CD83 und CD86 (Abbildung 5.3-B), der MHC-Komponenten HLA-DR und  $\beta_2$ M (Abbildung 5.3-C), sowie von CD95 und PD-L1 induzierte (Abbildung 5.3-D).



**Abbildung 5.3: Oberflächenantigenexpression auf dendritischen Zellen unter Einfluss von LPS in Kombination mit Flagellin bzw. MDP**

Zur Generierung von unreifen DCs (iDC, *immature DC*) wurden humane Monozyten mit 10 % FCS, GM-CSF und IL-4 über sieben Tage kultiviert. Die gewonnenen iDCs wurden daraufhin für zwei weitere Tage mit 10 ng/ml LPS (LPS-DC), LPS 10 ng/ml und 100 ng/ml Flagellin (Flag+LPS-DC) oder 10 ng/ml LPS und 100 ng/ml MDP (MDP+LPS-DC) inkubiert. Am Tag neun erfolgte die direkte Oberflächenfärbung der geernteten Zellen mit monoklonalen Antikörpern gegen **(A)** CD1a und CD14, **(B)** CD80, CD83 und CD86, **(C)** HLA-DR und  $\beta_2$ M und **(D)** CD95 und PD-L1. Als Kontrolle dienten LPS-DCs. Die Antigenexpression wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert des Median der Fluoreszenzintensität aus mindestens sechs unabhängigen Experimenten  $\pm$  SD.

Die durch die Kombination der Stimuli unveränderte Expression der Marker CD1a und CD86 ist in Abbildung 5.4 anhand eines repräsentativen Einzelexperimentes dargestellt. Es zeigt sich also, dass sowohl Flagellin als auch MDP die LPS-Antwort nicht verändern und die resultierenden DCs, gemessen an typischen Oberflächenmarkern, einen vergleichbaren Reifungsstatus aufweisen.



**Abbildung 5.4: Durchflusszytometrische Darstellung der Oberflächenantigenexpression von CD1a und CD86 auf dendritischen Zellen unter Einfluss von LPS in Kombination mit Flagellin bzw. MDP**

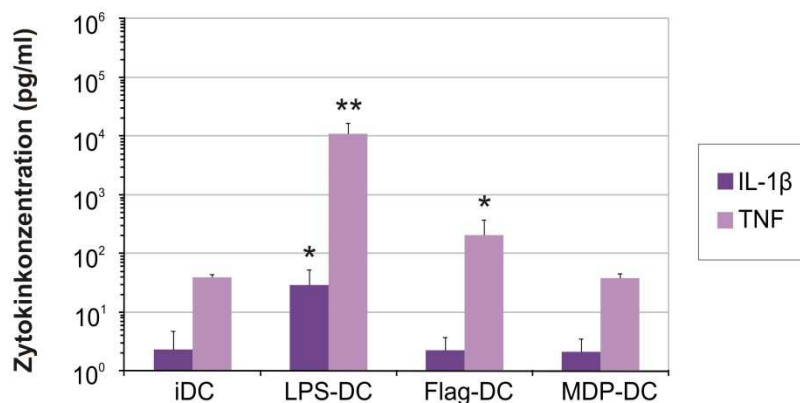
Zur Generierung von unreifen DCs (iDC, *immature DC*) wurden humane Monozyten mit 10 % FCS, GM-CSF und IL-4 über sieben Tage kultiviert. Die gewonnenen iDCs wurden daraufhin zwei weitere Tage mit 10 ng/ml LPS (LPS-DC), LPS 10 ng/ml und 100 ng/ml Flagellin (Flag+LPS-DC) oder 10 ng/ml LPS und 100 ng/ml MDP (MDP+LPS-DC) inkubiert. Am Tag neun erfolgte die direkte Oberflächenfärbung der geernteten Zellen mit monoklonalen Antikörpern gegen (A) CD1a und (B) CD86. Als Kontrolle dienten LPS-DCs. Die Antigenexpression wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Gezeigt ist jeweils die Population der Kontrolle und der stimulierten DCs (schwarze bzw. graue Kurven). Als Negativkontrollen dienten entsprechende Isotypenkontrollen (weiße Kurven). Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus sechs unabhängigen Experimenten.

## 5.2 Analyse der Zytokinproduktion dendritischer Zellen nach Inkubation mit bakteriellen Komponenten

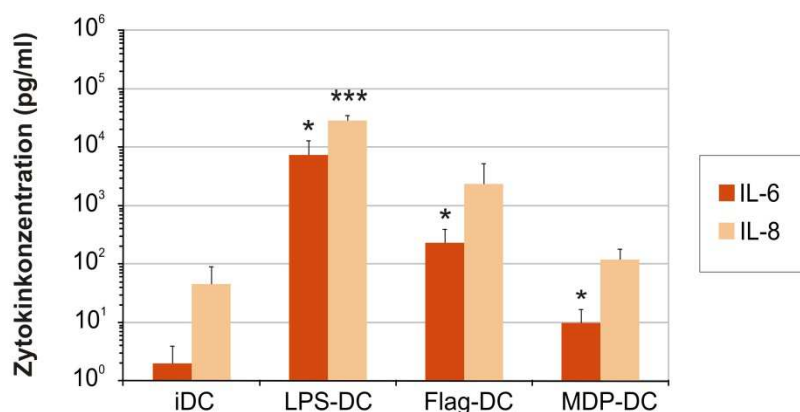
Die Detektion von bakteriellen Bestandteilen über PRRs induziert über die Aktivierung von NF $\kappa$ B-Signalkaskaden die Sekretion proinflammatorischer Zytokine und Chemokine wie IL-1 $\beta$ , TNF, IL-6, IL-8 und IL-12 (siehe 1.2.2). Des Weiteren induzieren bakterielle Komponenten die Sekretion des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 und des für die Funktion von T<sub>H</sub>17-Zellen essentielle Zytokin IL-23 [36, 67, 281]. Daher wurde im Folgenden der Einfluss von LPS, Flagellin und MDP als Bestandteile sowohl grampositiver als auch gramnegativer Bakterien auf die Zytokinantwort von DCs anhand der Messung der genannten proinflammatorischen Zytokine, sowie von IL-10 mittels ELISA-Messung analysiert.

### 5.2.1 Zytokinsekretion dendritischer Zellen nach Stimulation mit LPS, Flagellin und MDP

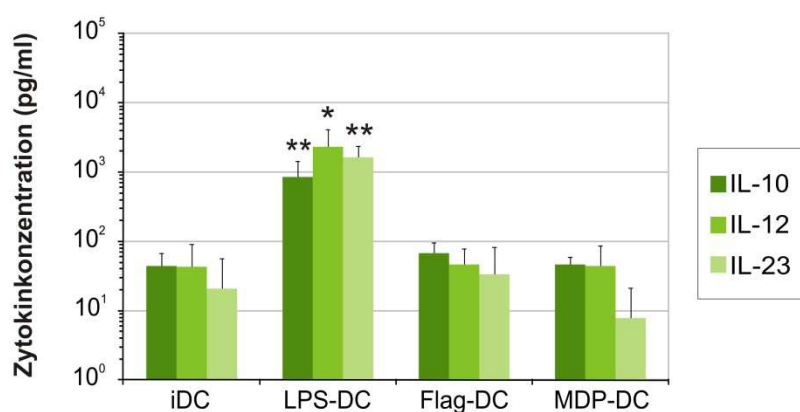
**A**



**B**



**C**



**Abbildung 5.5: Zytokinsekretion dendritischer Zellen nach Stimulation mit LPS, Flagellin und MDP**

Zur Generierung von unreifen DCs (iDC, *immature DC*) wurden humane Monozyten mit 10 % FCS, GM-CSF und IL-4 über sieben Tage kultiviert. Die gewonnenen iDCs wurden daraufhin zwei weitere Tage mit 10 ng/ml LPS (LPS-DC), 100 ng/ml Flagellin (Flag-DC) oder 100 ng/ml MDP (MDP DC) inkubiert, am Tag neun geerntet und die Zytokine in den Kulturüberständen bestimmt. Als Kontrolle dienten iDCs. Die Analyse von **(A)** IL-1 $\beta$  und TNF, **(B)** IL-6 und IL-8, sowie **(C)** IL-10, IL-12 und IL-23 erfolgte mittels ELISA. Die Daten stellen die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten  $\pm$  SD dar. Die statistische Analyse erfolgte mittels des Student's t-test: \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$  relativ zu iDCs.

Die Messung der Zytokinproduktion der DCs, die mit LPS, Flagellin oder MDP stimuliert wurden, erfolgte mittels ELISA aus den Überständen der an Tag neun geernteten DCs.

Wie in Abbildung 5.5-A gezeigt, sezernierten LPS-DCs im Vergleich zu iDCs eine signifikant größere Menge der Zytokine IL-1 $\beta$  und TNF. Ebenso wurde TNF durch die Stimulation mit Flagellin im Vergleich zur Kontrolle signifikant verstärkt gebildet. MDP hatte keinen Einfluss auf die TNF- bzw. IL-1 $\beta$ -Zytokinsekretion.

Sowohl LPS, Flagellin als auch MDP führten zu einer signifikant erhöhten IL-6-Sekretion im Vergleich zu unreifen Zellen, wobei LPS die stärkste Zytokinantwort hervorrief. Flagellin induzierte, verglichen mit MDP, eine signifikant höhere IL-6-Freisetzung.

Auch IL-8 wurde nach Inkubation mit LPS im Vergleich zu iDCs signifikant stärker von den DCs sezerniert, wohingegen MDP und Flagellin im Vergleich zur Kontrolle nur eine tendenziell verstärkte Sekretion von IL-8 aufwiesen (Abbildung 5.5-B).

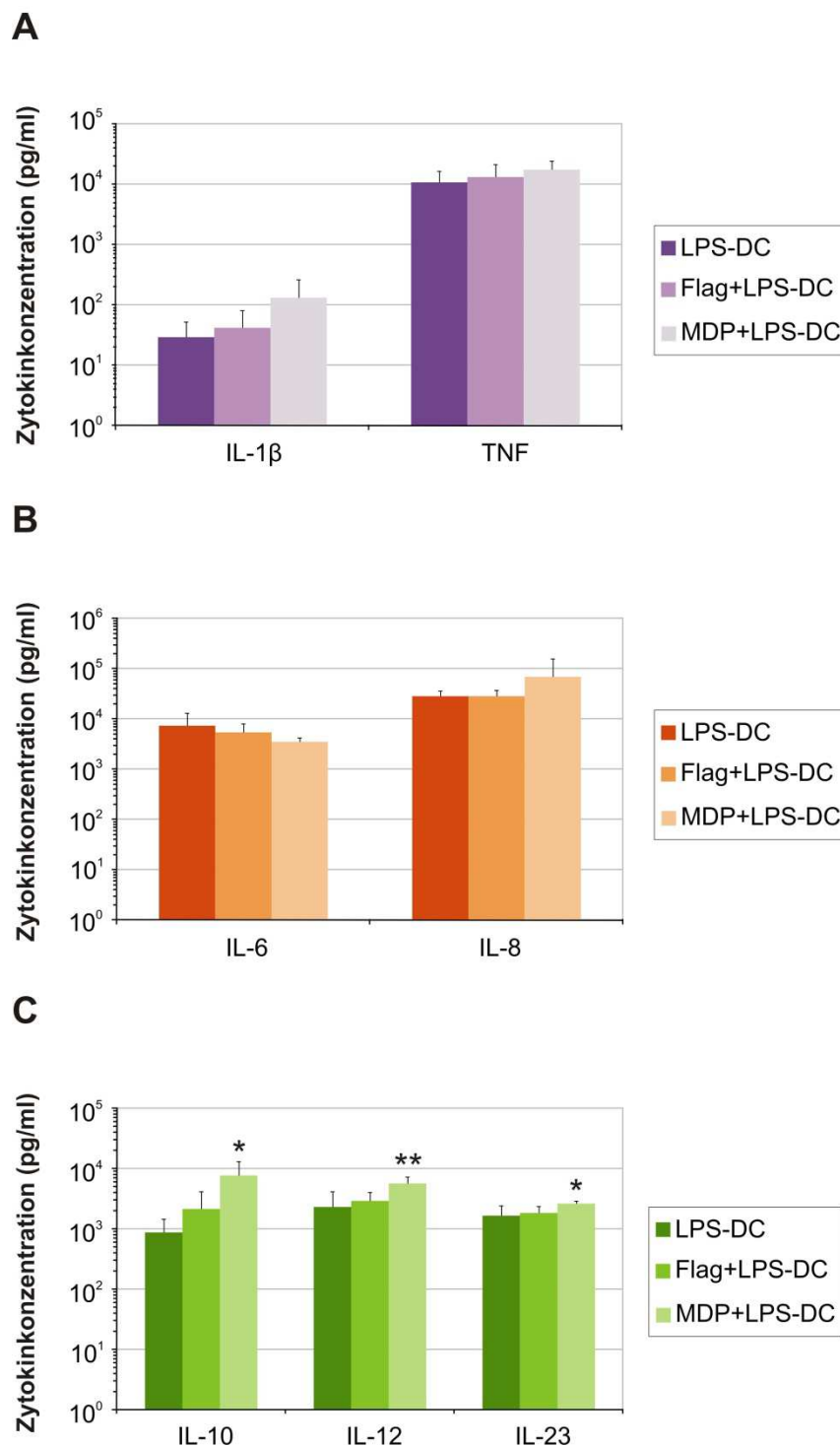
LPS-DCs setzten im Vergleich zu iDCs signifikant höhere Konzentrationen von IL-10, IL-12 und IL-23 frei, wobei Flagellin und MDP keinen wesentlichen Einfluss auf die Produktion der drei Zytokine zeigten (Abbildung 5.5-C).

### **5.2.2 Zytokinsekretion dendritischer Zellen nach Stimulation mit LPS in Kombination mit Flagellin bzw. MDP**

Die Freisetzung der in Kapitel 5.2 beschriebenen Zytokine durch DCs wurden auch bei Inkubation der DCs mit LPS in Kombination mit Flagellin bzw. mit MDP in den Überständen mittels ELISA analysiert.

Wie Abbildung 5.6 zeigt, ergaben sich bezüglich der Sekretion von IL-1 $\beta$ , TNF, IL-6 und IL-8 keine signifikanten Unterschiede zwischen LPS und den Kombinationen aus LPS mit Flagellin bzw. MDP. Allerdings zeigte sich eine signifikant verstärkte Freisetzung von IL-10, IL-12 und IL-23 bei der Inkubation mit LPS plus MDP im Vergleich zur alleinigen LPS-Stimulation (Abbildung 5.6-C). Zudem ließ sich eine tendenziell verstärkte Sekretion von IL-1 $\beta$  und IL-8 bei der Kombination von LPS mit MDP beobachten (Abbildung 5.6-A und -B).

Insgesamt führt MDP somit in Kombination mit LPS zu einem veränderten Zytokinprofil der DC, auch wenn bezüglich der Oberflächenantigenexpression keine Veränderungen nachweisbar waren.



**Abbildung 5.6: Zytokinsekretion dendritischer Zellen nach Stimulation mit LPS in Kombination mit Flagellin bzw. MDP**

Zur Generierung von unreifen DCs (iDC, *immature DC*) wurden humane Monozyten mit 10 % FCS, GM-CSF und IL-4 über sieben Tage kultiviert. Die gewonnenen iDCs wurden daraufhin zwei weitere Tage mit 10 ng/ml LPS (LPS-DC), LPS 10 ng/ml und 100 ng/ml Flagellin (Flag+LPS-DC) oder 10 ng/ml LPS und 100 ng/ml MDP (MDP+LPS-DC) inkubiert, am Tag neun geerntet und die Zytokine in den Kulturüberständen bestimmt. Die Analyse von **(A)** IL-1 $\beta$  und TNF, **(B)** IL-6 und IL-8 und **(C)** IL-10, IL-12 und IL-23 erfolgte mittels ELISA. Die Daten stellen die Mittelwerte aus mindestens fünf unabhängigen Experimenten  $\pm$  SD dar. Die statistische Analyse erfolgte mittels des Student's t-test: \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  relativ zu LPS-DCs.



### 5.3 Analyse der Genexpression dendritischer Zellen nach Inkubation mit bakteriellen Komponenten

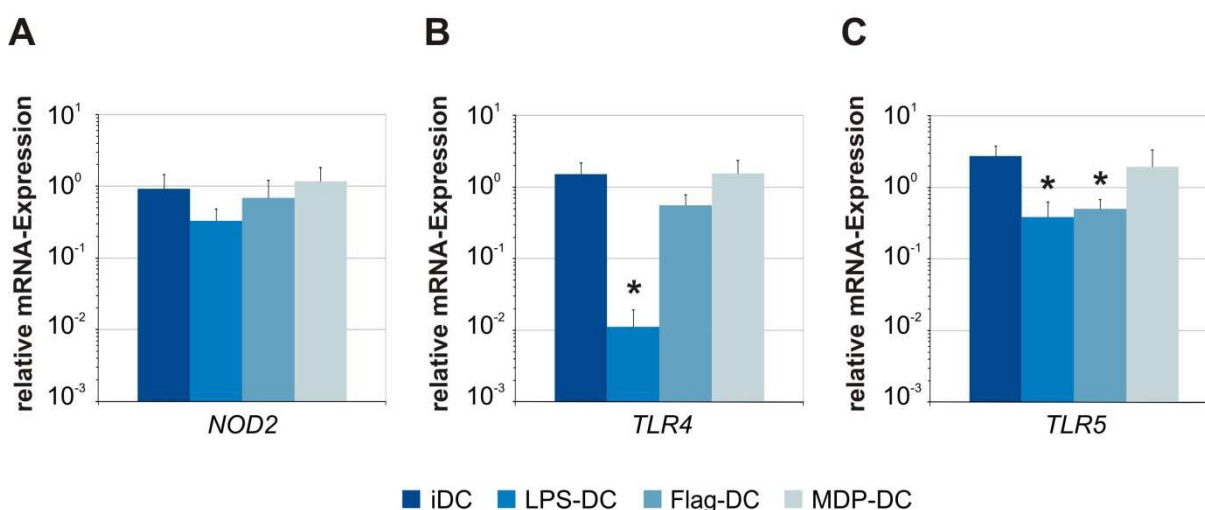
Weiterhin stellte sich die Frage, inwiefern die unterschiedlichen bakteriellen Stimuli die Genexpression von DCs beeinflussen. Hierzu wurden die DCs mit LPS, Flagellin und MDP, sowie deren Kombinationen inkubiert, im Anschluss die RNA der DCs isoliert und die mRNA-Expression verschiedener Gene mittels „real-time“ quantitativer Polymerasekettenreaktion (RT-qPCR, *real-time quantitative polymerase-chain-reaction*) relativ zur Expression der *18S rRNA* quantifiziert.

#### 5.3.1 Genexpression von Komponenten des angeborenen Immunsystems in dendritischen Zellen

Im Folgenden wurde der Einfluss der bakteriellen Komponenten auf die Genexpression des LPS-Rezeptors *TLR4*, des Flagellin-Rezeptors *TLR5* sowie der MDP-Rezeptoren *NOD2* und *NALP3* und des Autophagosomenbestandteils *ATG16L1* quantitativ detektiert.

##### 5.3.1.1 Genexpression in dendritischen Zellen nach Inkubation mit LPS, Flagellin und MDP

An Tag neun wurden die DCs, die mit LPS, Flagellin oder MDP stimuliert wurden, geerntet, deren RNA isoliert und durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Die relative mRNA-Expression von *TLR4*, *TLR5*, *NOD2* sowie *NALP3* und *ATG16L1* wurde mittels RT-qPCR ermittelt. Die Expressionslevel wurden auf die Expression von *18S rRNA* normalisiert.



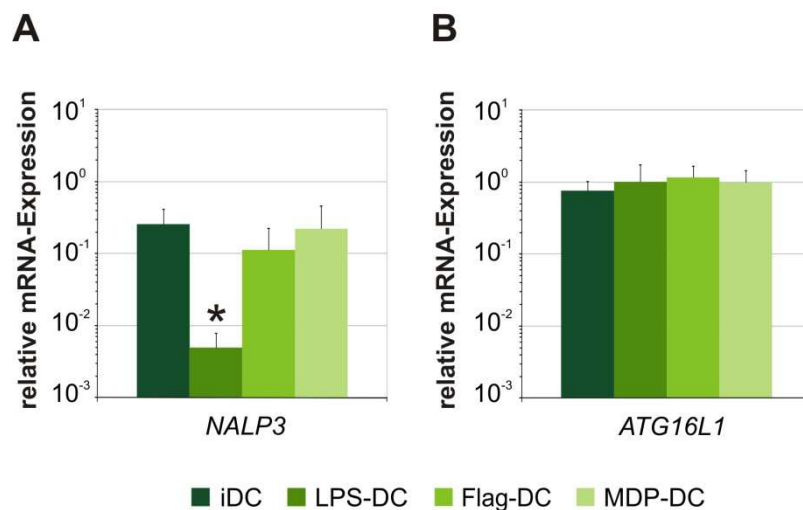
**Abbildung 5.7: Einfluss von LPS, Flagellin und MDP auf die mRNA-Expression von *TLR4*, *TLR5* und *NOD2* in dendritischen Zellen**

Zur Generierung von unreifen DCs (iDC, *immature DC*) wurden humane Monozyten mit 10 % FCS, GM-CSF und IL-4 über sieben Tage kultiviert. Die gewonnenen iDCs wurden daraufhin zwei weitere Tage mit 10 ng/ml LPS (LPS-DC), 100 ng/ml Flagellin (Flag-DC) oder 100 ng/ml MDP (MDP-DC) inkubiert. An Tag neun wurden die Zellen geerntet, die RNA isoliert und durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Die relative mRNA-Expression von (A) *NOD2*, (B) *TLR4* und (C) *TLR5* wurde mittels RT-qPCR ermittelt. Alle gemessenen Expressionslevel wurden auf die Expression von *18S rRNA* normalisiert. Als Kontrolle dienten iDCs. Gezeigt ist der Mittelwert der gemessenen mRNA-Expression aus mindestens vier unabhängigen Experimenten  $\pm$  SD. Die statistische Analyse erfolgte mittels des Student's t-test: \* $P < 0,05$  relativ zu iDCs.

Abbildung 5.7-A lässt erkennen, dass LPS-DCs im Vergleich zu iDCs und Flag-DCs tendenziell eine Herunterregulation der *NOD2*-mRNA-Expression zeigten. Jedoch ließ sich kein signifikanter Unterschied der mRNA-Expression von *NOD2* zwischen iDCs, LPS-DCs, Flag-DCs bzw. MDP-DCs beobachten.

LPS-DCs exprimierten die *TLR4*-mRNA im Vergleich zur Kontrolle in signifikant vermindertem Ausmaß. Im Vergleich zu iDCs zeigten Flag-DCs und MDP-DCs keinen wesentlichen Einfluss auf die mRNA-Expression von *TLR4* (Abbildung 5.7-B).

Wie in Abbildung 5.7-C gezeigt, war die *TLR5*-mRNA-Expression sowohl in LPS-DCs als auch in Flag-DCs gegenüber der Kontrolle signifikant geringer. MDP beeinflusste die mRNA-Expression von *TLR5* im Vergleich zur Kontrolle nicht.



**Abbildung 5.8: Einfluss von LPS, Flagellin und MDP auf die mRNA-Expression von *NALP3* und *ATG16L1* in dendritischen Zellen**

Zur Generierung von unreifen DCs (iDC, *immature DC*) wurden humane Monozyten mit 10 % FCS, GM-CSF und IL-4 über sieben Tage kultiviert. Die gewonnenen iDCs wurden daraufhin zwei weitere Tage mit 10 ng/ml LPS (LPS-DC), 100 ng/ml Flagellin (Flag-DC) oder 100 ng/ml MDP (MDP-DC) inkubiert. Am Tag neun wurden die Zellen geerntet, die RNA isoliert und durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Die relative mRNA-Expression von **(A) *NALP3*** und **(B) *ATG16L1*** wurde mittels RT-qPCR ermittelt. Alle gemessenen Expressionslevel wurden auf die Expression von *18S rRNA* normalisiert. Als Kontrolle dienten iDCs. Gezeigt ist der Mittelwert der gemessenen mRNA-Expression aus mindestens vier unabhängigen Experimenten  $\pm$  SD. Die statistische Analyse erfolgte mittels des Student's t-test: \* $P < 0,05$  relativ zu iDCs.

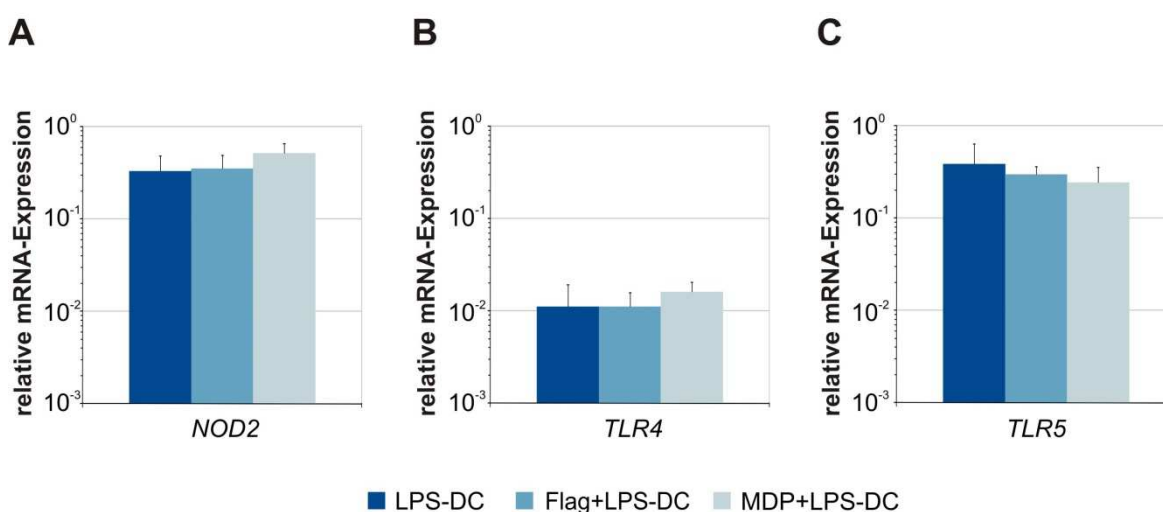
Die mRNA-Expression von *NALP3* war bei Inkubation mit LPS im Vergleich zu iDCs, Flag-DCs und MDP-DCs signifikant verringert (Abbildung 5.8-A).

Die Expression von *ATG16L1* wurde im Vergleich zum unstimulierten Status durch die bakteriellen Komponenten nicht beeinflusst (Abbildung 5.8-B).

### 5.3.1.2 Genexpression in dendritischen Zellen nach Inkubation mit LPS in Kombination mit Flagellin bzw. MDP

Die RNA wurde auch aus den DCs, die mit den Kombinationen aus LPS und Flagellin bzw. MDP stimuliert wurden, isoliert und durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Die relative mRNA-Expression von *TLR4*, *TLR5*, *NOD2* sowie *NALP3* und *ATG16L1* wurde mittels RT-qPCR ermittelt. Die gemessenen Expressionslevel wurden auf die Expression von *18S rRNA* normalisiert.

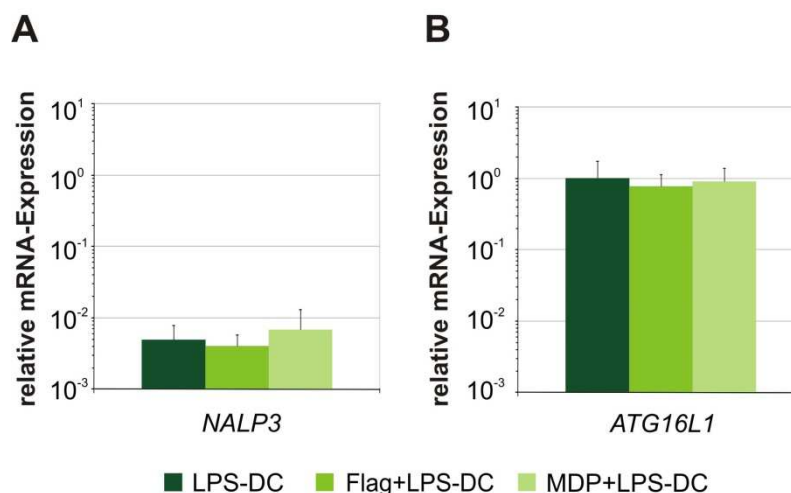
Abbildung 5.9 verdeutlicht, dass die Kombinationen aus LPS und Flagellin bzw. MDP eine äquivalente mRNA-Expression von *NOD2*, *TLR4* und *TLR5* zeigten, wie die nur mit LPS-stimulierten Zellen.



**Abbildung 5.9: Einfluss von LPS in Kombination mit Flagellin bzw. MDP auf die mRNA-Expression von *TLR4*, *TLR5* und *NOD2* in dendritischen Zellen**

Zur Generierung von unreifen DCs (iDC, *immature DC*) wurden humane Monozyten mit 10 % FCS, GM-CSF und IL-4 über sieben Tage kultiviert. Die gewonnenen iDCs wurden daraufhin zwei weitere Tage mit 10 ng/ml LPS (LPS-DC), LPS 10 ng/ml und 100 ng/ml Flagellin (Flag+LPS-DC) oder 10 ng/ml LPS und 100 ng/ml MDP (MDP+LPS-DC) inkubiert. Am Tag neun wurden die Zellen geerntet, die RNA isoliert und durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Die relative mRNA-Expression von (A) *TLR4*, (B) *TLR5* und (C) *NOD2* wurde mittels RT-qPCR ermittelt. Alle gemessenen Expressionslevel wurden auf die Expression von *18S rRNA* normalisiert. Gezeigt ist der Mittelwert der gemessenen mRNA-Expression aus mindestens vier unabhängigen Experimenten  $\pm$  SD.

Des Weiteren wurde die mRNA-Expression von *NALP3* und *ATG16L1* durch die kombinierte Inkubation von LPS mit Flagellin bzw. MDP im Vergleich zu LPS alleine nicht beeinflusst (Abbildung 5.10). Demzufolge haben weder Flagellin noch MDP, welches das Zytokinprofil von LPS-DCs verändert, einen modulierenden Einfluss auf die mRNA-Expression der PRRs und *ATG16L1* in LPS-DCs.



**Abbildung 5.10: Einfluss von LPS in Kombination mit Flagellin bzw. MDP auf die mRNA-Expression von *NALP3* und *ATG16L1* in dendritischen Zellen**

Zur Generierung von unreifen DCs (iDC, *immature DC*) wurden humane Monozyten mit 10 % FCS, GM-CSF und IL-4 über sieben Tage kultiviert. Die gewonnenen iDCs wurden daraufhin zwei weitere Tage mit 10 ng/ml LPS (LPS-DC), LPS 10 ng/ml und 100 ng/ml Flagellin (Flag+LPS-DC) oder 10 ng/ml LPS und 100 ng/ml MDP (MDP+LPS-DC) inkubiert. Am Tag neun wurden die Zellen geerntet, die RNA isoliert und durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Die relative mRNA-Expression von (A) *NALP3* und (B) *ATG16L1* wurde mittels RT-qPCR ermittelt. Alle gemessenen Expressionslevel wurden auf die Expression von *18S rRNA* normalisiert. Gezeigt ist der Mittelwert der gemessenen mRNA-Expression aus mindestens vier unabhängigen Experimenten  $\pm$  SD.

### 5.3.2 Genexpression von Komponenten des Tryptophanstoffwechsels in dendritischen Zellen

Wie in Kapitel 1.2.4.1 beschrieben, sind die Enzyme Indolamin-2,3-Dioxygenase 1 und 2 (IDO1 und IDO2) beim Abbau der Aminosäure Tryptophan zu Kynurenin beteiligt und spielen eine wichtige Rolle im Rahmen der Toleranzentwicklung des Immunsystems. Der entstandene IDO-Metabolit Kynurenin übt hierbei seine immunmodulatorische Wirkung über den im Zytosol befindlichen Transkriptionsfaktor Arylhydrocarbonrezeptor (AHR) aus.

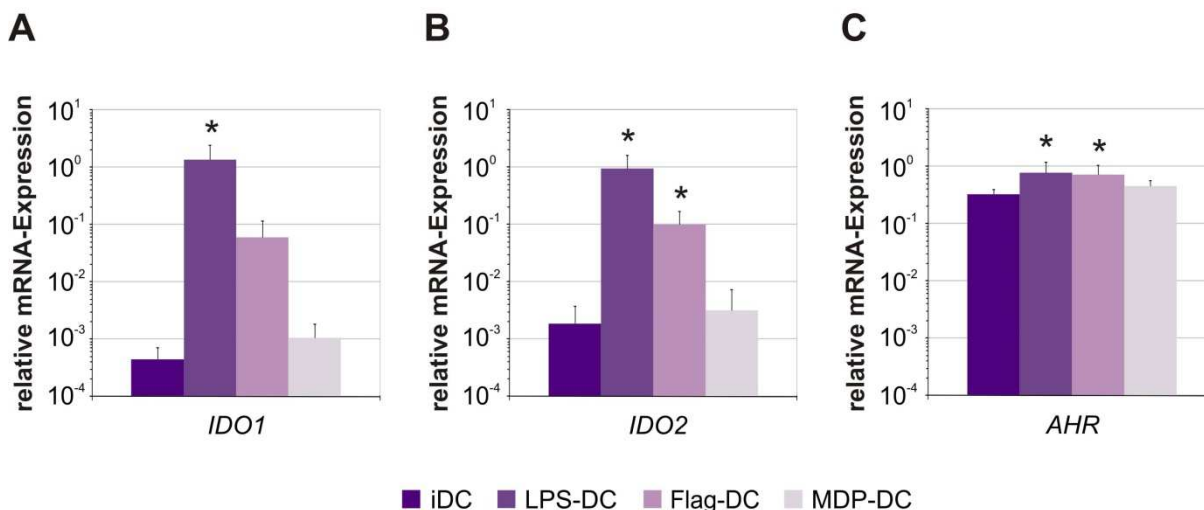
#### 5.3.2.1 Genexpression in dendritischen Zellen nach Inkubation mit LPS, Flagellin und MDP

An Tag neun wurden die DCs, die mit LPS, Flagellin oder MDP stimuliert wurden, geerntet, deren RNA isoliert und durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Die relative mRNA-Expression von *IDO1*, *IDO2* und *AHR* wurde mittels RT-qPCR ermittelt. Die gemessenen Expressionslevel wurden auf die Expression von *18S rRNA* normalisiert.

Wie Abbildung 5.11-A veranschaulicht, zeigten LPS-DCs im Vergleich zu iDCs eine signifikant verstärkte mRNA-Expression von *IDO1*. Die Inkubation mit Flagellin führte ebenfalls im Vergleich zur Kontrolle zu einer tendenziell verstärkten *IDO1*-mRNA-Expression. MDP hatte keinen wesentlichen Einfluss auf die mRNA-Expression dieses Enzyms.

Die *IDO2*-mRNA wurde sowohl nach Inkubation mit LPS als auch mit Flagellin im Vergleich zur Kontrolle signifikant verstärkt exprimiert, wohingegen MDP-DCs im Vergleich zu iDCs keine Einfluss auf die mRNA-Expression von *IDO2* zeigten (Abbildung 5.11-B).

Die mRNA-Expression von *AHR* war in LPS-DCs und in Flag-DCs im Vergleich zu iDCs signifikant erhöht. MDP hatte im Vergleich zur Kontrolle keinen Einfluss auf die *AHR*-mRNA-Expression (Abbildung 5.11-C). Demzufolge scheint LPS als proinflammatorischer Stimulus sowie auch Flagellin immunregulatorische Mechanismen zu induzieren, die einer überschießenden Immunantwort entgegenwirken sollen.



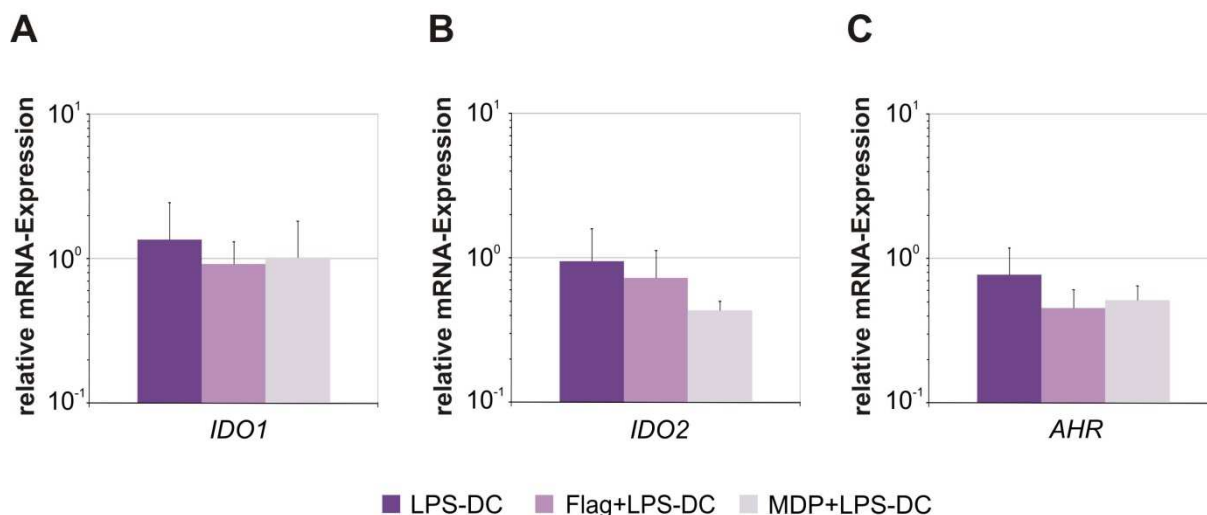
**Abbildung 5.11: Einfluss von LPS, Flagellin und MDP auf die mRNA-Expression von *IDO1*, *IDO2* und *AHR* in dendritischen Zellen**

Zur Generierung von unreifen DCs (iDC, *immature DC*) wurden humane Monozyten mit 10 % FCS, GM-CSF und IL-4 über sieben Tage kultiviert. Die gewonnenen iDCs wurden daraufhin zwei weitere Tage mit 10 ng/ml LPS (LPS-DC), 100 ng/ml Flagellin (Flag-DC) oder 100 ng/ml MDP (MDP-DC) inkubiert. Am Tag neun wurden die Zellen geerntet, die RNA isoliert und durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Die relative mRNA-Expression von (A) *IDO1*, (B) *IDO2* und (C) *AHR* wurde mittels RT-qPCR ermittelt. Alle gemessenen Expressionslevel wurden auf die Expression von *18S rRNA* normalisiert. Als Kontrolle dienten iDCs. Gezeigt ist der Mittelwert der gemessenen mRNA-Expression aus mindestens vier unabhängigen Experimenten  $\pm$  SD. Die statistische Analyse erfolgte mittels des Student's t-test: \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  relativ zu iDCs.

### 5.3.2.2 Genexpression in dendritischen Zellen nach Inkubation mit LPS in Kombination mit Flagellin bzw. MDP

Die RNA wurde auch aus den DCs, die mit den Kombinationen aus LPS und Flagellin bzw. MDP stimuliert wurden, isoliert und durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Die relative mRNA-Expression von *IDO1*, *IDO2* und *AHR* wurde mittels RT-qPCR ermittelt. Die gemessenen Expressionslevel wurden auf die Expression von *18S rRNA* normalisiert.

Die Inkubation der DCs mit den Kombinationen aus LPS mit Flagellin bzw. MDP hatte einen tendenziell negativen, aber nicht signifikanten Einfluss auf die mRNA-Expression von sowohl *IDO1*, als auch *IDO2* sowie *AHR* (Abbildung 5.12-A, -B und -C). Demzufolge verstärkten weder Flagellin noch MDP die Induktion dieser immunregulatorischen Enzyme in LPS-DCs.



**Abbildung 5.12: Einfluss von LPS in Kombination mit Flagellin bzw. MDP auf die mRNA-Expression von IDO1, IDO2 und AHR in dendritischen Zellen**

Zur Generierung von unreifen DCs (iDC, *immature DC*) wurden humane Monozyten mit 10 % FCS, GM-CSF und IL-4 über sieben Tage kultiviert. Die gewonnenen iDCs wurden daraufhin zwei weitere Tage mit 10 ng/ml LPS (LPS-DC), LPS 10 ng/ml und 100 ng/ml Flagellin (Flag+LPS-DC) oder 10 ng/ml LPS und 100 ng/ml MDP (MDP+LPS-DC) inkubiert. Am Tag neun wurden die Zellen geerntet, die RNA isoliert und durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Die relative mRNA-Expression von (A) IDO1, (B) IDO2 und (C) AHR wurde mittels RT-qPCR ermittelt. Alle gemessenen Expressionslevel wurden auf die Expression von 18S rRNA normalisiert. Gezeigt ist der Mittelwert der gemessenen mRNA-Expression aus mindestens vier unabhängigen Experimenten  $\pm$  SD.

### 5.3.3 Genexpression wichtiger Enzyme des Vitamin A- und Vitamin D<sub>3</sub>-Stoffwechsels in dendritischen Zellen

Sowohl die Aldehyddehydrogenasen ALDH1A1-3 des Vitamin A-Stoffwechsels als auch die 25-Hydroxy-Vitamin D<sub>3</sub>-1 $\alpha$ -Hydroxylase CYP27B1 des Vitamin D<sub>3</sub>-Stoffwechsels zeichnen sich durch ihre immunmodulatorischen und immunsupprimierenden Funktionen im Rahmen der Immunantwort aus (siehe Kapitel 1.2.4.2 und 1.2.4.3). Aus diesem Grund stellte sich die Frage, ob auch bakterielle Bestandteile die Expression dieser Enzyme beeinflussen können.

#### 5.3.3.1 Genexpression in dendritischen Zellen nach Inkubation mit LPS, Flagellin und MDP

Am Tag neun wurden die DCs, die mit LPS, Flagellin oder MDP stimuliert wurden, geerntet, deren RNA isoliert und durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Die relative mRNA-Expression von ALDH1A1-3 und CYP27B1 wurde mittels RT-qPCR ermittelt. Die gemessenen Expressionslevel wurden auf die Expression von 18S rRNA normalisiert.

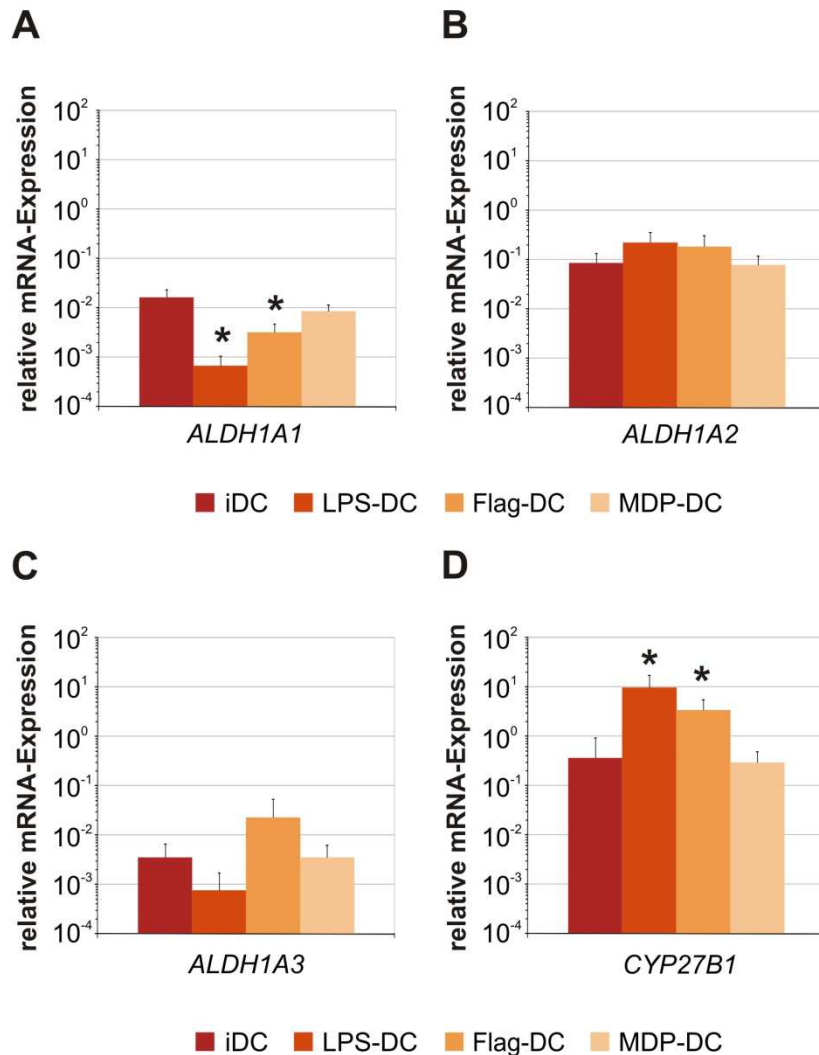
Wie in Abbildung 5.13-A gezeigt, führte die Inkubation mit LPS sowie mit Flagellin im Vergleich zur Kontrolle zur signifikant verminderten mRNA-Expression von ALDH1A1. Keinen Einfluss auf die mRNA-Expression des Enzyms ließ sich bei MDP-DCs beobachten.

Die ALDH1A2-mRNA-Expression wurde durch keine der bakteriellen Komponenten im Vergleich zur Kontrolle beeinflusst (Abbildung 5.13-B).



Abbildung 5.13-C veranschaulicht, dass die *ALDH1A3*-mRNA-Expression weder durch LPS, noch durch Flagellin oder MDP signifikant verändert wurde.

Die *CYP27B1*-mRNA wurde in LPS-DCs und Flag-DCs im Vergleich zu iDCs signifikant verstärkt exprimiert. MDP hatte keinen Einfluss auf die mRNA-Expression von *CYP27B1* (Abbildung 5.13-D).

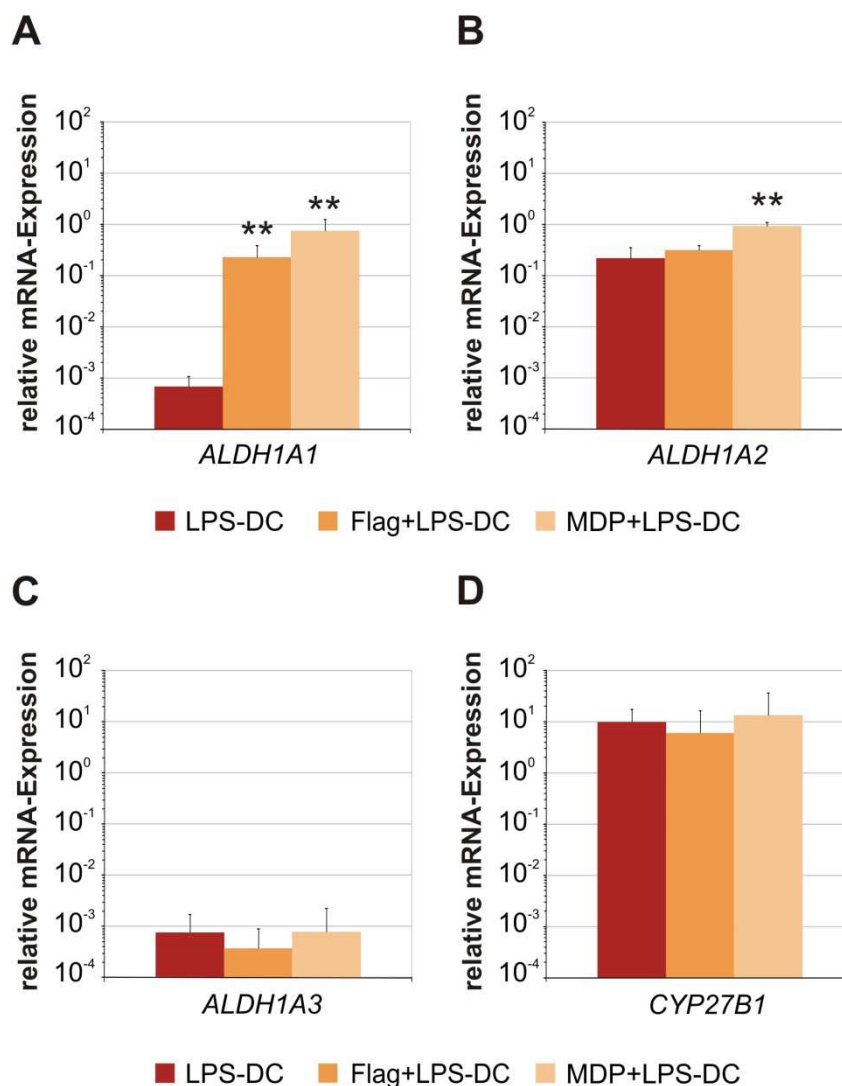


**Abbildung 5.13: Einfluss von LPS, Flagellin und MDP auf die mRNA-Expression von *ALDH1A1*, *ALDH1A2*, *ALDH1A3* und *CYP27B1* in dendritischen Zellen**

Zur Generierung von unreifen DCs (iDC, *immature DC*) wurden humane Monozyten mit 10 % FCS, GM-CSF und IL-4 über sieben Tage kultiviert. Die gewonnenen iDCs wurden daraufhin zwei weitere Tage mit 10 ng/ml LPS (LPS-DC), 100 ng/ml Flagellin (Flag-DC) oder 100 ng/ml MDP (MDP-DC) inkubiert. Am Tag neun wurden die Zellen geerntet, die RNA isoliert und durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Die relative mRNA-Expression von (A) *ALDH1A1*, (B) *ALDH1A2*, (C) *ALDH1A3* und (D) *CYP27B1* wurde mittels RT-qPCR ermittelt. Alle gemessenen Expressionslevel wurden auf die Expression von *18S rRNA* normalisiert. Als Kontrolle dienten iDCs. Gezeigt ist der Mittelwert der gemessenen mRNA-Expression aus mindestens vier unabhängigen Experimenten  $\pm$  SD. Die statistische Analyse erfolgte mittels des Student's t-test: \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  relativ zu iDCs.

### 5.3.3.2 Genexpression in dendritischen Zellen nach Inkubation mit LPS in Kombination mit Flagellin bzw. MDP

Die RNA wurde ebenfalls aus den DCs, die mit den Kombinationen aus LPS und Flagellin bzw. MDP stimuliert wurden, isoliert und durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Die relative mRNA-Expression von *ALDH1A1-3* und *CYP27B1* wurde mittels RT-qPCR ermittelt. Die gemessenen Expressionslevel wurden auf die Expression von *18S rRNA* normalisiert.



**Abbildung 5.14: Einfluss von LPS in Kombination mit Flagellin bzw. MDP auf die mRNA-Expression von *ALDH1A1*, *ALDH1A2*, *ALDH1A3* und *CYP27B1* in dendritischen Zellen**

Zur Generierung von unreifen DCs (iDC, *immature DC*) wurden humane Monozyten mit 10 % FCS, GM-CSF und IL-4 über sieben Tage kultiviert. Die gewonnenen iDCs wurden daraufhin zwei weitere Tage mit 10 ng/ml LPS (LPS-DC), LPS 10 ng/ml und 100 ng/ml Flagellin (Flag+LPS-DC) oder 10 ng/ml LPS und 100 ng/ml MDP (MDP+LPS-DC) inkubiert. Am Tag neun wurden die Zellen geerntet, die RNA isoliert und durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Die relative mRNA-Expression von (A) *ALDH1A1*, (B) *ALDH1A2*, (C) *ALDH1A3* und (D) *CYP27B1* wurde mittels RT-qPCR ermittelt. Alle gemessenen Expressionslevel wurden auf die Expression von *18S rRNA* normalisiert. Gezeigt ist der Mittelwert der gemessenen mRNA-Expression aus mindestens vier unabhängigen Experimenten  $\pm$  SD. Die statistische Analyse erfolgte mittels des Student's t-test: \*\* $P < 0,01$  relativ zu LPS-DCs.



Sowohl die Kombination von LPS mit Flagellin als auch LPS mit MDP führte zu signifikant verstärkter mRNA-Expression von *ALDH1A1* (Abbildung 5.14-A). Zudem induzierte die Kombination von LPS und MDP eine signifikant erhöhte mRNA-Expression von *ALDH1A2* im Vergleich zur alleinigen LPS-Stimulation. Die kombinierte Inkubation von LPS und Flagellin beeinflusste die *ALDH1A2*-mRNA-Expression dagegen nicht (Abbildung 5.14-B).

Die mRNA-Expression von *ALDH1A3* und *CYP27B1* wurde durch die Kostimulation von LPS mit Flagellin bzw. MDP im Vergleich zu LPS alleine nicht signifikant verändert, wobei alle Zellen eine hohe *CYP27B1*-mRNA-Expression aufwiesen (Abbildung 5.14-C und -D).

Neben der signifikant verstärkten Sekretion von IL-12, IL-10 und IL-23 bei MDP+LPS-DCs, zeigt MDP also einen deutlich verstärkenden Effekt auf die mRNA-Expression von *ALDH1A1* und *ALDH1A2* in DCs, wohingegen es keinen Einfluss auf die Expression von *IDO*, *AHR* und *CYP27B1* hat. Flagellin induziert zudem ebenso eine verstärkte *ALDH1A1*-mRNA-Expression in den DCs. Dies spricht für eine Rolle von MDP und Flagellin in der Regulation des Vitamin A-Metabolismus.

## 5.4 Analyse der Induktion der allogenen T-Zellantwort durch dendritische Zellen nach Inkubation mit bakteriellen Komponenten

### 5.4.1 Analyse der allogenen T-Zellproliferation

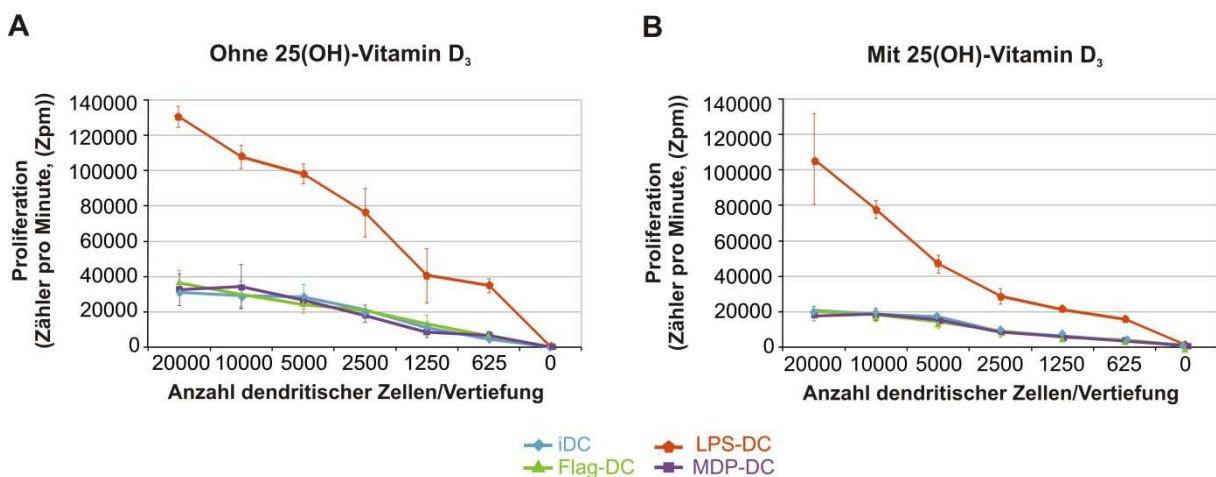
Wie in Kapitel 1.3.2.2 beschrieben, erkennen allogene T-Lymphozyten im Rahmen der Stammzelltransplantation (SZT) fremde HLA-Moleküle auf der Oberfläche dendritischer Zellen des Empfängers, was die Aktivierung und Proliferation der T-Zellen zur Folge hat. Um *in vitro* eine physiologische Situation nach allogener SZT nachzuahmen, kann man die „gemischte Leukozytenreaktion“ (MLR, *mixed leucocyte reaction*) verwenden.

Hierzu wurden die mit bakteriellen Komponenten inkubierten DCs in unterschiedlichen Konzentrationen für fünf Tage mit allogenen T-Lymphozyten kokultiviert und die Proliferationsrate der T-Zellen mittels Thymidineinbau ermittelt. Wie es in Grafik 5.13 aus Kapitel 5.3.3.1 zu sehen ist, exprimieren alle untersuchten DCs *CYP27B1* in verstärktem Ausmaß, sodass sie daher in der Lage sein müssten, aus der Vorstufe 25-Hydroxy-Vitamin D<sub>3</sub> (25(OH)-VD<sub>3</sub>) aktives 1,25-Dihydroxy-Vitamin D<sub>3</sub> (1,25(OH)<sub>2</sub>-VD<sub>3</sub>) zu bilden. Unter dieser Annahme wurde einem Teil der Ansätze 5 x 10<sup>-8</sup> M 25(OH)-VD<sub>3</sub> pro 10 µl hinzugefügt, um einen möglichen immunmodulatorischen Effekt von Vitamin D<sub>3</sub> auf die proliferierenden Immunzellen beurteilen zu können.

#### 5.4.1.1 Auswirkung der Stimulation dendritischer Zellen mit LPS, Flagellin und MDP auf die Proliferation allogener T-Zellen in An- und Abwesenheit von 25-Hydroxy-Vitamin D<sub>3</sub>

Die DCs, die mit LPS, Flagellin und MDP stimuliert wurden, wurden in absteigender Konzentration mit einer konstanten Anzahl an allogenen T-Zellen kokultiviert und nach fünf Tagen die T-Zellproliferation bei An- und Abwesenheit von 25(OH)-VD<sub>3</sub> in Abhängigkeit der vorherrschenden DC-Konzentration mittels Thymidineinbau analysiert.

Wie in Abbildung 5.15 anhand eines repräsentativen Einzel-experiments gezeigt, stieg die Proliferationsrate der allogenen T-Lymphozyten mit zunehmender Zahl an kokultivierten DCs an. Abbildung 5.15-A verdeutlicht, dass die mit LPS stimulierten DCs die stärkste T-Zellproliferation induzierten. Flag-DCs und MDP-DCs riefen im Vergleich zu iDCs keine verstärkte Proliferation der allogenen T-Zellen hervor.

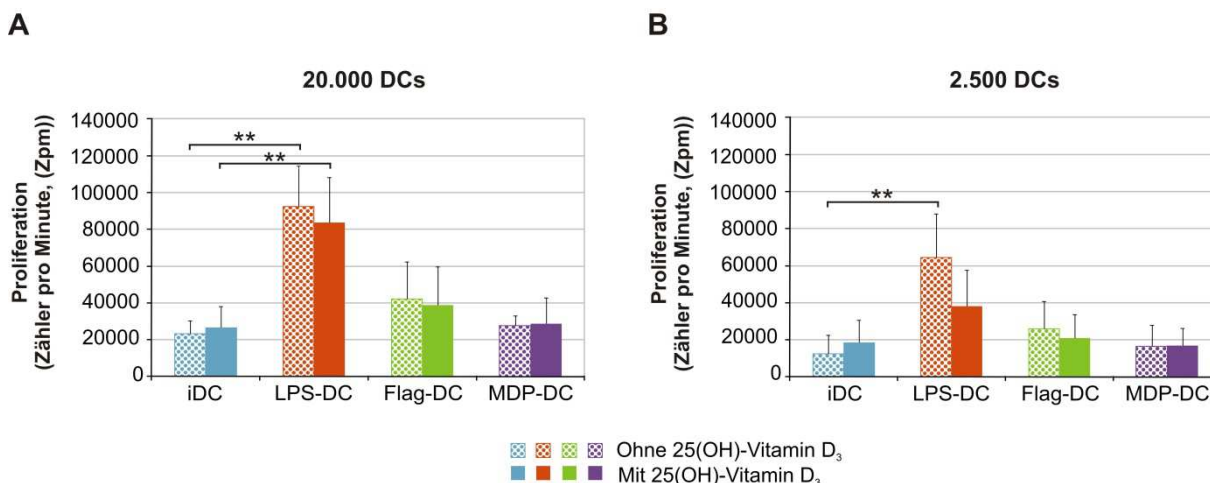


**Abbildung 5.15: Proliferation allogener T-Zellen nach Inkubation mit dendritischen Zellen unter Einfluss von LPS, Flagellin und MDP bei An- und Abwesenheit von 25-Hydroxy-Vitamin D<sub>3</sub>**

Zur Generierung von unreifen DCs (iDC, *immature DC*) wurden humane Monozyten mit 10 % FCS, GM-CSF und IL-4 über sieben Tage kultiviert. Die gewonnenen iDCs wurden daraufhin zwei weitere Tage mit 10 ng/ml LPS (LPS-DC), 100 ng/ml Flagellin (Flag-DC) oder 100 ng/ml MDP (MDP-DC) inkubiert. Am Tag neun wurden die Zellen geerntet und in unterschiedlichen Konzentrationen für weitere fünf Tage mit  $10^5$  allogenen T-Lymphozyten (**A**) ohne und (**B**) mit  $5 \times 10^{-8}$  M/10 µl/Ansatz 25-Hydroxy-Vitamin D<sub>3</sub> (25(OH)-VD<sub>3</sub>) kokultiviert. Als Kontrolle dienten iDCs. Die Proliferationsrate der T-Zellen wurde anhand der Bestimmung des [<sup>3</sup>H]-Thymidineinbaus in die DNA analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD aus Triplikaten eines repräsentativen Experiments aus fünf unabhängigen Experimenten.

Dies könnte mit der verminderten Expression der stimulatorischen Oberflächenantigene, wie z.B. CD80, CD86 oder MHC-II sowie der verminderten Freisetzung von IL-12 im Vergleich zu LPS zusammenhängen.

Der Zusatz von 25(OH)-VD<sub>3</sub> verminderte die Proliferation der T-Zellen in allen Ansätzen in Abhängigkeit der vorherrschenden DC-Konzentration sowie von der Art des Stimulus. Der stärkste suppressierende Effekt auf die allogene T-Zellproliferation war vor allem bei Kokultivation von 25(OH)-VD<sub>3</sub> mit LPS zu beobachten. Die Suppression zeigte sich vor allem bei niedrigen DC-Zahlen im Bereich von 625 bis 2.500 LPS-DCs im Verhältnis zu den T-Lymphozyten (Abbildung 5.15-B).



**Abbildung 5.16: Auswirkung der Stimulation dendritischer Zellen mit LPS, Flagellin und MDP auf die Proliferation allogener T-Zellen bei An- und Abwesenheit von 25-Hydroxy-Vitamin D<sub>3</sub> im Überblick**

Zur Generierung von unreifen DCs (iDC, *immature DC*) wurden humane Monozyten mit 10 % FCS, GM-CSF und IL-4 über sieben Tage kultiviert. Die gewonnenen iDCs wurden daraufhin zwei weitere Tage mit 10 ng/ml LPS (LPS-DC), 100 ng/ml Flagellin (Flag-DC) oder 100 ng/ml MDP (MDP-DC) inkubiert. Am Tag neun wurden die Zellen geerntet und in unterschiedlichen Konzentrationen für weitere fünf Tage mit  $10^5$  alloge- nen T-Lymphozyten ohne und mit  $5 \times 10^{-8}$  M/10  $\mu$ l/ Vertiefung 25-Hydroxy-Vitamin D<sub>3</sub> (25-(OH)-VD<sub>3</sub>) kokultiviert. Als Kontrolle dienten iDCs. Die Proliferationsrate der T-Zellen wurde anhand der Bestimmung des [<sup>3</sup>H]-Thymidineinbaus in die DNA analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD der in fünf unabhängigen Experimenten in Triplikaten ermittelten Durchschnittswerte bei einer Anzahl von (A) 20000 und (B) 2500 dendritischen Zellen/Vertiefung in An- und Abwesenheit von 25(OH)-VD<sub>3</sub>. Die statistische Analyse erfolgte mittels des Student's t-test: \*\* P<0,01 relativ zu iDCs ohne und mit 25(OH)-VD<sub>3</sub>.

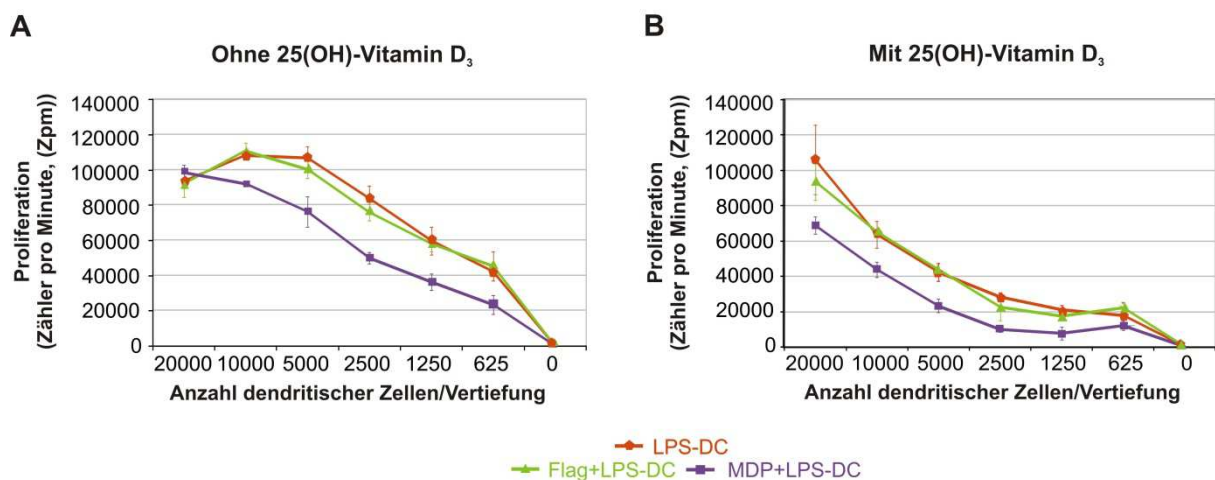
Abbildung 5.16 zeigt die Mittelwerte der Proliferation der alloge- nen T-Zellen. Es ließ sich eine signifikant verstärkte stimulatorische Wirkung von LPS-DCs im Vergleich zu iDCs auf die Proliferation von alloge- nen T-Zellen, sowohl bei hoher als auch niedriger DC-Anzahl erkennen (Abbildung 5.16-A und -B). Wie Abbildung 5.16-A veranschaulicht, blieb die Proliferationsrate der T-Zellen bei hohen LPS-DC-Mengen auch in Gegenwart von 25(OH)-VD<sub>3</sub> unverändert erhöht. Bei einer DC-Anzahl von 2.500 in Anwesenheit von 25(OH)-VD<sub>3</sub> zeigte sich eine leichte, aber nicht signifikante Suppression der T-Zellproliferation bei LPS-DCs (Abbildung 5.16-B). Flag-DCs und MDP-DCs induzierten die Proliferation der T-Zellen in etwa ebenso stark wie iDCs, unabhängig von der DC-Anzahl und Kokultivation mit 25(OH)-VD<sub>3</sub> (Abbildung 5.16-A und -B).

#### 5.4.1.2 Auswirkung der Stimulation dendritischer Zellen mit LPS in Kombination mit Flagellin bzw. MDP auf die Proliferation allogener T-Zellen in An- und Abwesenheit von 25-Hydroxy-Vitamin D<sub>3</sub>

Neben den einzeln verabreichten Stimuli wurden auch die Einflüsse der Kombination der bakteriellen Komponenten LPS mit Flagellin bzw. MDP bei An- und Abwesenheit von 25(OH)-VD<sub>3</sub> analysiert. Hierzu wurden die DCs, die mit LPS in Kombination mit Flagellin bzw. MDP stimuliert wurden, in absteigender Konzentration mit einer konstanten Anzahl an alloge- nen T-Zellen kokultiviert und nach fünf Tagen die T-Zellproliferation ermittelt.

Wie schon in Abschnitt 5.4.1.1 beschrieben, verstärkte sich die Proliferation der T-Zellen bei zunehmender Anzahl der kokultivierten DCs. Das in Abbildung 5.17-A dargestellte repräsentative Experiment in Abwesenheit von 25(OH)-VD<sub>3</sub>, zeigte im Vergleich zu LPS alleine keine gesteigerte T-Zellproliferation bei der Kombination von LPS mit Flagellin. Bei DC-Zahlen von 625 bis 10.000 war bei der Kombination von LPS mit MDP eine leicht reduzierte Proliferation der T-Lymphozyten messbar.

Unter Einfluss von 25(OH)-VD<sub>3</sub> wurde bei allen drei Versuchsansätzen eine Inhibition der T-Zellproliferation beobachtet. Die stärkste Ausprägung des supprimierenden Effekts von 25(OH)-VD<sub>3</sub> zeigte sich bei DC-Mengen von 1.250 bis 10.000 DCs, jedoch nur in geringem Ausmaß bei sehr hohen DC-Anzahlen wie 20.000 DCs (Abbildung 5.17-B).



**Abbildung 5.17: Proliferation allogener T-Zellen nach Inkubation mit dendritischen Zellen unter Einfluss von LPS in Kombination mit Flagellin bzw. MDP bei An- und Abwesenheit von 25-Hydroxy-Vitamin D<sub>3</sub>**

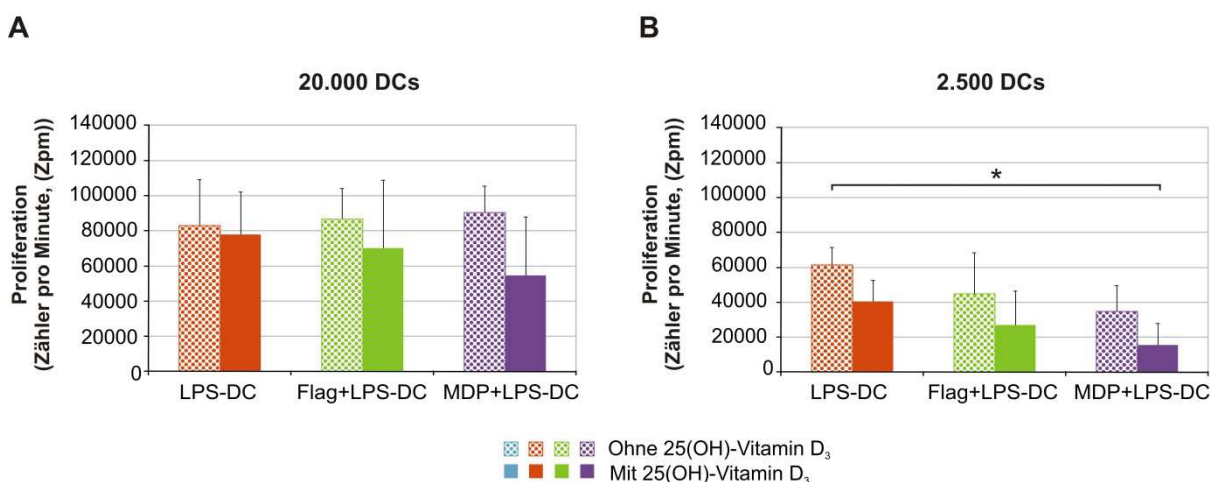
Zur Generierung von unreifen DCs (iDC, *immature DC*) wurden humane Monozyten mit 10 % FCS, GM-CSF und IL-4 über sieben Tage kultiviert. Die gewonnenen iDCs wurden daraufhin zwei weitere Tage mit 10 ng/ml LPS (LPS-DC), LPS 10 ng/ml und 100 ng/ml Flagellin (Flag+LPS-DC) oder 10 ng/ml LPS und 100 ng/ml MDP (MDP+LPS-DC) inkubiert. Am Tag neun wurden die Zellen geerntet und in unterschiedlichen Konzentrationen für weitere fünf Tage mit  $10^5$  allogenen T-Lymphozyten **(A)** ohne und **(B)** mit  $5 \times 10^{-8}$  M/10 µl/ Vertiefung 25-Hydroxy-Vitamin D<sub>3</sub> (25-(OH)-VD<sub>3</sub>) kokultiviert. Die Proliferationsrate der T-Zellen wurde anhand der Bestimmung des [<sup>3</sup>H]-Thymidineinbaus in die DNA analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD aus Triplikaten eines repräsentativen Experiments aus vier unabhängigen Experimenten.

Abbildung 5.18 zeigt die Mittelwerte der T-Zellproliferation bei Kokultivation mit hohen (20.000) und niedrigen (2.500) DC-Mengen in Abhängigkeit von 25(OH)-VD<sub>3</sub>. Wie in Abbildung 5.18-A verdeutlicht, ergab sich bei hohen DC-Mengen im Bereich von 20.000 unter den einzelnen Stimulationsansätzen bei Abwesenheit von 25(OH)-VD<sub>3</sub> kein wesentlicher Unterschied hinsichtlich der T-Zellproliferationsrate. Anders verhielt es sich bei niedrigen DC-Konzentrationen. MDP+LPS-DCs und Flag+LPS-DCs induzierten im Vergleich zu LPS-DCs eine tendenziell verminderte Proliferation der T-Zellen (Abbildung 5.18-B).

Unter Einfluss von 25(OH)-VD<sub>3</sub> ließ sich bei hohen und niedrigen DC-Zahlen eine tendenziell reduzierte T-Zellproliferationsrate bei den Kombinationen von LPS mit Flagellin bzw. MDP im Vergleich zur Stimulation mit LPS alleine beobachten (Abbildung 5.18-A und -B). Insbesondere bei niedrigen Konzentrationen induzierten MDP+LPS-DCs bei Anwesenheit von

25(OH)-VD<sub>3</sub> im Vergleich zu LPS-DCs ohne 25(OH)-VD<sub>3</sub>-Einfluss eine signifikant geringere allogene T-Zellproliferation (Abbildung 5.18-B).

Der leicht supprimierende Effekt von 25(OH)-VD<sub>3</sub> auf die T-Zellproliferation unter Einfluss von LPS zeigte sich erst bei niedrigen LPS-DC-Mengen (Abbildung 5.18-B). Zwar induzierte weder MDP noch Flagellin in Kombination mit LPS eine verstärkte mRNA-Expression von *CYP27B1* in den DCs, sie supprimierten jedoch in Kombination mit LPS bei Anwesenheit von 25(OH)-VD<sub>3</sub> die allogene T-Zellproliferation.



**Abbildung 5.18: Auswirkung der Stimulation dendritischer Zellen mit LPS in Kombination mit Flagellin bzw. MDP auf die Proliferation allogener T-Zellen bei An- und Abwesenheit von 25-Hydroxy-Vitamin D<sub>3</sub> im Überblick**

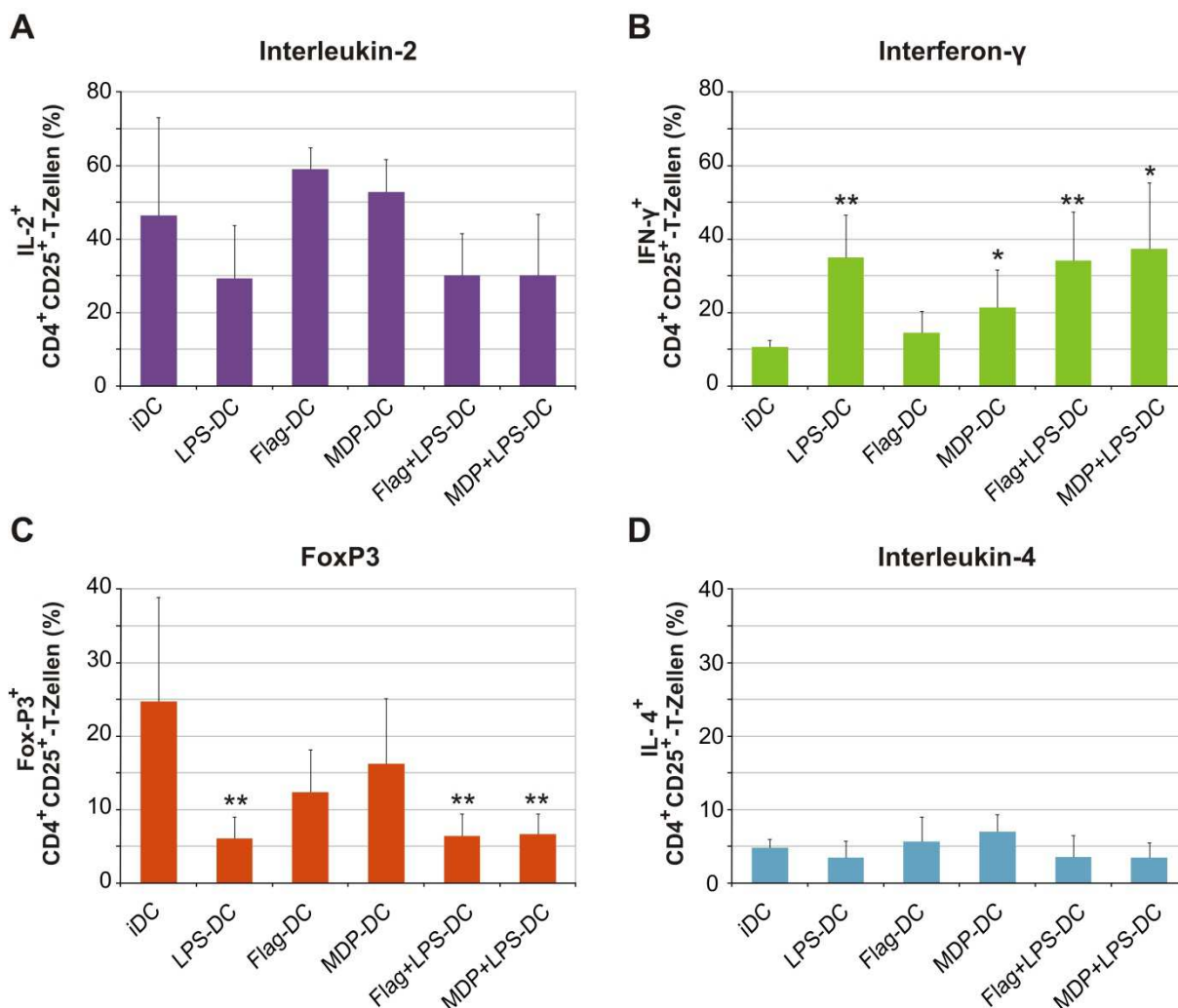
Zur Generierung von unreifen DCs (iDC, *immature DC*) wurden humane Monozyten mit 10 % FCS, GM-CSF und IL-4 über sieben Tage kultiviert. Die gewonnenen iDCs wurden daraufhin zwei weitere Tage mit 10 ng/ml LPS (LPS-DC), LPS 10 ng/ml und 100 ng/ml Flagellin (Flag+LPS-DC) oder 10 ng/ml LPS und 100 ng/ml MDP (MDP+LPS-DC) inkubiert. An Tag neun wurden die Zellen geerntet und in unterschiedlichen Konzentrationen für weitere fünf Tage mit  $10^5$  allogeenen T-Lymphozyten ohne und mit  $5 \times 10^{-8}$  M/10  $\mu$ l Vertiefung 25-Hydroxy-Vitamin D<sub>3</sub> (25-(OH)-VD<sub>3</sub>) kokultiviert. Die Proliferationsrate der T-Zellen wurde anhand der Bestimmung des [<sup>3</sup>H]-Thymidineinbaus in die DNA analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD der in vier unabhängigen Experimenten in Triplikaten ermittelten Durchschnittswerte bei einer Anzahl von (A) 20000 und (B) 2500 DCs/Vertiefung in An- und Abwesenheit von 25-(OH)-VD<sub>3</sub>. Die statistische Analyse erfolgte mittels des Student's t-test: \*  $P < 0,05$  relativ zu LPS-DCs ohne 25(OH)-VD<sub>3</sub>.

#### 5.4.2 Analyse der Zytokinproduktion allogener T-Zellen

Durch Interaktion von DCs und allogeenen T-Zellen im Rahmen der SZT kommt es durch die Erkennung von fremden MHC-Molekülen zur Induktion einer T-Zellantwort. Wie in Kapitel 1.2.3 erläutert, lassen sich die einzelnen CD4<sup>+</sup> T-Zellsubtypen anhand der Sekretion unterschiedlicher Zytokine unterscheiden. Die Differenzierung dieser Zellen wird dabei maßgeblich durch die Interaktion mit DCs beeinflusst.

Um einen möglichen Einfluss der bakteriellen Komponenten hinsichtlich der Polarisierung der allogeenen T-Zellantwort über DCs analysieren zu können, wurden die Anzahl an IL-2<sup>+</sup> und IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> (T<sub>H</sub>1), IL-17<sup>+</sup> (T<sub>H</sub>17) und IL-4<sup>+</sup> (T<sub>H</sub>2) sowie FoxP3<sup>+</sup> (Treg) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen nach Inkubation mit den DCs, die entweder mit LPS, Flagellin oder MDP isoliert oder mit den Kombinationen aus LPS und Flagellin bzw. MDP stimuliert wurden, durchflusszytometrisch ermittelt.





**Abbildung 5.19: Einfluss der Stimulation dendritischer Zellen mit LPS, Flagellin und MDP, sowie deren Kombinationen auf die Immunantwort allogener CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen auf Ebene des intrazellulären Zytokin gehaltes und der FoxP3-Expression**

Zur Generierung von unreifen DCs (iDC, *immature DC*) wurden humane Monozyten mit 10 % FCS, GM-CSF und IL-4 über sieben Tage kultiviert. Die gewonnenen iDCs wurden daraufhin zwei weitere Tage mit 10 ng/ml LPS (LPS-DC), 100 ng/ml Flagellin (Flag-DC) oder 100 ng/ml MDP (MDP-DC), LPS 10 ng/ml und 100 ng/ml Flagellin (Flag+LPS-DC) oder 10 ng/ml LPS und 100 ng/ml MDP (MDP+LPS-DC) inkubiert. Am Tag neun wurden die Zellen geerntet und weitere fünf Tage mit allogeenen T-Lymphozyten kokultiviert. Nach Vorstimulation der Zellen mit PMA/Ionomycin, erfolgte die Intrazellulärfärbung der Zellen mit den Antikörpern gegen IL-2, IFN-γ und IL-4 sowie FoxP3 und die durchflusszytometrische Analyse am LSR II. Dargestellt ist der prozentuale Anteil an (A) IL-2-, (B) IFN-γ-, (C) FoxP3- und (D) IL-4- positiven CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen als Mittelwert aus mindestens drei unabhängigen Experimenten +/- SD. Als Kontrolle dienten iDCs. Die statistische Analyse erfolgte mittels des Student's t-test: \*P<0,05, \*\*P<0,01 relativ zu iDCs.

Zur Detektion der intrazellulären Zytokine IL-2, IFN-γ, IL-17 und IL-4 erfolgte die Stimulation der Zellen mit PMA und Ionomycin und die direkte Antikörperfärbung gegen CD3, CD4, CD8 und CD25, um die T-Zellfraktion aus der Kokultur abgrenzen zu können. Im Anschluss wurden die Zellen permeabilisiert und fixiert sowie intrazellulär mit Antikörpern gegen die genannten Zytokine angefärbt. Die Vorgehensweise der Färbung des Transkriptionsfaktors FoxP3 erfolgte mit Ausnahme der Vorstimulation mit PMA/Ionomycin analog. Die gefärbten T-Zellen wurden daraufhin durchflusszytometrisch analysiert. Die Färbung und die Analysen

wurden freundlicherweise von Rüdiger Eder aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Matthias Edinger und PD Dr. Petra Hoffmann, Universitätsklinikum Regensburg übernommen.

Abbildung 5.19 zeigt die prozentualen Anteile der IL-2-, IFN- $\gamma$ -, FoxP3- oder IL-4-positiven aktivierten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen nach Kokultur mit unterschiedlich stimulierten DCs. Es konnten keine IL-17-positiven T-Zellen detektiert werden.

Wie in Abbildung 5.19-A veranschaulicht, zeigten weder LPS-DCs, noch Flag-DCs noch MDP-DCs im Vergleich zu iDCs einen Einfluss auf die Anzahl von IL-2-positiven T-Zellen. Demgegenüber zeigt Abbildung 5.19-B, dass LPS-DCs im Vergleich zu iDCs einen signifikant verstärkten Anteil an IFN- $\gamma$ -positiven T-Lymphozyten in der Kokultur induzierten. MDP-DCs riefen im Vergleich zu iDCs einen signifikant höheren Anteil IFN- $\gamma$ -positiver T-Zellen hervor, wobei sich der Effekt von Flag-DCs nicht zu dem von iDCs unterschied.

Die Inkubation mit LPS-DCs führte im Vergleich zu iDCs zu einem signifikant reduzierten Anteil FoxP3-positiver T-Zellen. Flag-DCs und MDP-DCs beeinflussten allerdings den Anteil an FoxP3-positiven T-Zellen im Vergleich zu iDCs nicht wesentlich (Abbildung 5.19-C).

Der prozentuale Anteil IL-4-positiver T-Lymphozyten war verglichen mit dem von IL-2-, IFN- $\gamma$ - und FoxP3-sezernierenden Zellen gering. Bezüglich der Generierung von IL-4-positiven T-Zellen ergaben sich weder durch die Inkubation der T-Zellen mit LPS-DCs, noch Flag-DCs oder MDP-DCs im Vergleich zu iDCs wesentliche Unterschiede (Abbildung 5.19-D).

Die Inkubation der T-Zellen mit LPS+Flagellin-DCs bzw. LPS+MDP-DCs zeigten vergleichbare Einflüsse wie LPS-DCs und veränderten die Polarisierung der allo-genen T-Zellantwort nicht (Abbildung 5.19-A bis D).

## 6 Diskussion

### 6.1 Charakterisierung humaner dendritischer Zellen nach Inkubation mit bakteriellen Komponenten

Die Translokation von bakteriellen Komponenten wie beispielsweise Lipopolysaccharid (LPS) durch eine geschädigte Epithelbarriere in das Gewebe spielt eine wesentliche Rolle in der Pathogenese der akuten „Graft-versus-Host-Disease“ (GvHD) [232-237]. Nach bisherigen Kenntnissen haben hierbei dendritische Zellen (DC, *dendritic cell*) als Antigen-präsentierende Zellen (APC, *antigen-presenting cell*) eine essentielle Bedeutung in der Detektion dieser bakteriellen Komponenten und der Induktion der für die akute GvHD typischen Entzündungsreaktion [214, 239, 240]. Die vorliegende Arbeit befasste sich daher mit der Fragestellung, inwiefern die bakteriellen Komponenten LPS, Flagellin und Muramyl-dipeptid (MDP) als Bestandteile sowohl grampositiver als auch gramnegativer Bakterien die Eigenschaften von DCs beeinflussen.

#### 6.1.1 Oberflächenantigenexpression dendritischer Zellen

Zunächst wurde die Oberflächenantigenexpression der DC-Reifungsmarker CD1a und CD83, des Monozytenmarkers CD14, der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 sowie die Expression von HLA (Humanes Leukozyten-Antigen) -DR und  $\beta_2$ M ( $\beta_2$ -Mikroglobulin) auf den DCs nach Inkubation mit LPS, Flagellin und MDP sowie deren Kombinationen analysiert. Unabhängig von den bakteriellen Komponenten, mit denen die unreifen DCs (iDC, *immature DC*) an Tag sieben inkubiert wurden, zeigten alle DCs eine äquivalente Expression von CD1a und CD14, wobei CD14 im Vergleich zu CD1a in wesentlich geringerem Ausmaß auf den DCs exprimiert wurde.

Allerdings zeigten sich unterschiedliche Einflüsse der bakteriellen Komponenten bezüglich der Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80, CD86, von CD83 sowie von HLA-DR und  $\beta_2$ M. LPS induzierte im Vergleich zu iDCs eine verstärkte Expression von CD80, CD83 und CD86, sowie von HLA-DR und  $\beta_2$ M. Diese Beobachtungen wurden in der Literatur sowohl bei humanen als auch bei murinen DCs beschrieben [8, 10, 17, 34, 35, 282].

Flagellin induzierte zwar im Vergleich zu iDCs eine verstärkte Expression des kostimulatorischen Moleküls CD80, allerdings in deutlich geringerem Ausmaß als LPS. Zudem führte es zu keiner Veränderung der Expression der Reifungsmarker CD83, CD86, HLA-DR und  $\beta_2$ M. Bei Untersuchungen von murinen DCs durch Dowling *et al.* und Dearman *et al.*, sowie von humanen DCs durch Means *et al.* ließen sich jedoch erhöhte Expressionslevel für sowohl CD80, als auch CD83 und CD86 nach Flagellin-Einfluss auf den DCs beobachten [10, 34, 35]. In den Experimenten von Means *et al.* konnte zudem gezeigt werden, dass sich die Expression der DC-Moleküle CD80, CD83 und CD86 auf der DC-Oberfläche sowie die Expression deren mRNA mit steigender Flagellinkonzentration erhöhte und die Moleküle bei 60nM Flagellin ( $\approx 3000$  ng/ml im Vgl. zu 100 ng/ml) annähernd so stark exprimiert wurden wie unter



Einfluss von LPS [10]. Die unterschiedlichen Beobachtungen lassen sich möglicherweise auf den Einsatz von murinen DCs bei Dowling *et al.* und Dearman *et al.*, aber auch auf die Verwendung verschiedener Flagellinkonzentrationen zurückführen.

Im Gegensatz zu LPS und Flagellin zeigte MDP keinen Einfluss auf die Expression der fünf beschriebenen Oberflächen-Moleküle. Dies steht in Einklang mit Ergebnissen von Fritz *et al.*, Uehori *et al.* und Tsuji *et al.*, die keine Veränderungen bezüglich der Expression von CD80, CD83 und CD86 sowie von HLA-DR und  $\beta_2$ M bei humanen DCs unter MDP-Stimulation im Vergleich zum unstimulierten Zustand beobachten konnten [17, 283, 284]. Uehori *et al.* veranschaulichten in ihren Untersuchungen jedoch, dass synthetische Derivate von MDP, wie beispielsweise 6-O-acetyliertes MDP, durchaus die verstärkte Expression von CD83, CD86 und HLA-DR sowie von  $\beta_2$ M und somit eine DC-Reifung induzieren konnten [283]. Die Arbeitsgruppe von Tada *et al.* beobachtete jedoch bei humanen DCs eine erhöhte Expression von CD80, CD83 und CD86 unter MDP-Einfluss. Hierbei muss allerdings angemerkt werden, dass bei den Experimenten von Tada *et al.*, im Vergleich zur vorliegenden Arbeit, eine 100-fach höhere Konzentration von MDP (10  $\mu$ g/ml im Vgl. zu 0,1  $\mu$ g/ml) eingesetzt wurde und die Zellen einen Tag länger mit dem Stimulus inkubiert wurden, sodass möglicherweise deutlich höhere MDP-Level zu einer verstärkten Expression der DC-Reifungsmarker führen könnten [282]. Fraglich ist in diesem Zusammenhang allerdings, inwieweit die hohen eingesetzten Flagellin- und MDP-Konzentrationen *in vivo* auch tatsächlich erreicht werden.

Bei der Kombination von LPS mit Flagellin bzw. MDP ergaben sich bezüglich der Oberflächenantigenexpression von CD80, CD83 und CD86, sowie von HLA-DR und  $\beta_2$ M auf den DCs keine wesentlichen Unterschiede im Vergleich zur alleinigen LPS-Stimulation. Die Ergebnisse von Tada *et al.* bestätigen diese Beobachtungen für die Kombination von LPS und MDP bezüglich der Expression von CD80 und CD86 [282]. Im Gegensatz dazu beschreibt Fritz *et al.* synergistische Effekte der Kombination von LPS und MDP bezüglich der Expression von CD80, CD83 und CD86 sowie von HLA-DR und  $\beta_2$ M auf humanen DCs. Allerdings wurde hierbei eine nur sehr geringe LPS-Konzentration von 40 pg/ml (im Vgl. zu 10 ng/ml) in Kombination mit MDP eingesetzt [17]. Möglicherweise wird aber bei hohen LPS-Konzentrationen von 10 ng/ml durch LPS alleine eine schon so deutliche DC-Reifung induziert, dass MDP keinen synergistischen Effekt hinsichtlich der Expression der Reifungsmarker zusätzlich bewirkt.

Da DCs neben kostimulatorischen auch koinhibitorische Moleküle zum Erhalt der Immunhomöostase exprimieren, wurde des Weiteren die Oberflächenantigenexpression von CD95, dem Ligand für CD95 (CD95L) und PD-L1 (*programmed cell death-ligand 1*) auf den DCs nach Inkubation mit LPS, Flagellin und MDP sowie deren Kombinationen analysiert. CD95L wurde in allen getesteten Kulturbedingungen kaum exprimiert und durch die bakteriellen Stimuli nicht induziert. Dies steht im Einklang mit der Beobachtung, dass CD95L bisher nur auf aktivierten T- Zellen und NK-Zellen zu detektieren war [285]. Zwar führte eine verstärkte Expression von CD40 auf murinen Langerhanszellen der Haut, die als professionelle APCs hinsichtlich ihrer Funktion und ihres Phänotyps den DCs sehr ähnlich sind, zur gleichzeitigen

Expression von CD95L, allerdings zeigte hierbei LPS keinen Einfluss auf die Expression des Moleküls [286].

Im Gegensatz dazu regulierten LPS und die Kombinationen mit Flagellin bzw. MDP im Vergleich zu iDCs die Expression des Fas-Rezeptors CD95 signifikant nach oben, wohingegen Flagellin bzw. MDP alleine keinen Einfluss auf dessen Oberflächenexpression zeigte. Wie in Kapitel 1.2.3 beschrieben, wird CD95 auf unreifen DCs exprimiert [59-61]. In Kongruenz mit den Ergebnissen dieser Arbeit zeigten andere Gruppen, dass proinflammatorische Reize, wie LPS, eine verstärkte Expression von CD95 auf den DCs induziert [61, 287-289]. Interessanterweise zeigten diese reifen DCs in den genannten Arbeiten eine Resistenz gegenüber der Fas-FasL-induzierten Apoptose, wohingegen unreife DCs durch den CD95-CD95L-abhängigen Zelltod zerstört wurden [60, 61, 287-289]. Dem gegenüber stehen die Beobachtungen von Matsue *et al.* und Chen *et al.*, dass reife DCs nach Stimulation durch Antigen-spezifischen T-Lymphozyten dazu neigen, sich über Perforin- und Fas-abhängige Mechanismen gezielt zu vernichten. Demzufolge wirkt hierbei die Fas-abhängige Apoptose der DCs einer übermäßigen DC-Akkumulation sowie einer unkontrollierten T-Zellaktivierung entgegen, um vor Autoimmunität zu schützen. Allerdings konnten diese Beobachtungen nur bei Versuchen mit murinen DCs gemacht werden [290, 291].

Die Expression des koinhibitorischen Moleküls PD-L1 wurde, wie die von CD95, durch die bakteriellen Komponenten gleichermaßen beeinflusst. Der Einfluss von LPS und deren Kombinationen führte im Vergleich zu iDCs zu einer signifikant verstärkten Expression von PD-L1. Diese Ergebnisse decken sich mit Beobachtungen von Klipers *et al.* und Sumpter *et al.*, dass PD-L1, im Gegensatz zu iDCs, erst auf reifen DCs exprimiert wird und im Sinne der Aufrechterhaltung der Homöostase die T-Zellaktivierung beendet [292, 293]. Zudem wird die Expression von PD-L1 durch das antiinflammatorische IL-10 auf DCs induziert [36, 58], welches wiederum in der vorliegenden Arbeit vermehrt von LPS-stimulierten DCs (LPS-DCs) freigesetzt wurde und die verstärkte Expression von PD-L1 autokrin induzieren könnte (siehe 6.1.2). Flagellin und MDP zeigten hingegen keinen Einfluss auf die Expression von PD-L1. Die Arbeitsgruppe von Castellaneta *et al.* veranschaulichte, dass hepatische plasmazytoide DCs (pDC) im Vergleich zu hepatischen myeloiden DCs nach MDP-Stimulation verstärkt PD-L1 auf ihrer Oberfläche exprimierten und mit einer verminderten Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie IL-12 und IL-6 auf eine darauf folgende LPS-Stimulation reagierten [294]. Allerdings wurden bei den Versuchen Leber-DCs von Mäusen eingesetzt, wodurch die Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen der vorgelegten Dissertation eingeschränkt ist.

### 6.1.2 Zytokinsekretion dendritischer Zellen

Des Weiteren wurde der Einfluss der bakteriellen Komponenten LPS, Flagellin und MDP, sowie deren Kombinationen auf die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 $\beta$ , Tumornekrosefaktor (TNF), IL-6, IL-8, IL-12 und IL-23 sowie des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 durch DCs untersucht. Ähnlich wie auf Ebene der Oberflächenantigenexpression, zeigten sich auch hier deutliche Unterschiede bezüglich der Einflüsse der bakteriellen Komponenten.

Die Zytokine IL-1 $\beta$ , TNF und IL-6 spielen durch ihre Wirkung als Induktoren einer lokalen Gewebszerstörung sowie der Aktivierung von neutrophilen Granulozyten und Endothelzellen eine wichtige Rolle im Rahmen der Entzündungsantwort. Zudem regen sie T- und B-Lymphozyten zur Proliferation und Differenzierung an und induzieren durch ihre systemische Wirkung Fieber [1, 2, 66, 295]. Alle drei Zytokine wurden nach LPS-Stimulation im Vergleich zu iDCs in signifikant verstärktem Maße von den DCs freigesetzt. Sowohl in Mausmodellen von Dowling *et al.* und Dearman *et al.*, sowie bei Untersuchungen humaner DCs von Fritz *et al.*, Visintin *et al.* und Chamorro *et al.* konnte dieser Einfluss von LPS beobachtet werden [8, 17, 34, 35, 296]. Des Weiteren induzierte LPS im Vergleich zur Kontrolle, zu Flagellin und MDP, eine signifikant verstärkte Sekretion von IL-8, welches chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten wirkt [297], sowie der proinflammatorischen Zytokine IL-12 und IL-23. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit einer Vielzahl an vorausgehenden Arbeiten [10, 17, 25, 34, 35, 283, 296, 298]. Des Weiteren führte bei Untersuchungen von Nabelschnur-DCs bei Jang *et al.* besonders die Kombination von IL-12 mit LPS zu einer verstärkten Freisetzung von IL-23 [299].

LPS induzierte nicht nur die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen, sondern führte im Vergleich zur Kontrolle, zu Flagellin bzw. MDP zur signifikant verstärkten Freisetzung des antiinflammatorischen Zytokins IL-10. IL-10 kontrolliert das Ausmaß und die Intensität einer Entzündungsantwort, reguliert Wachstum und Differenzierung von B- und T-Lymphozyten, NK-Zellen, Granulozyten, DCs sowie von Epithelzellen und Keratinozyten [71]. Es hemmt zum einen die stimulatorische Kapazität von DCs durch die Herabregulation kostimulatorischer Moleküle [20], zum anderen blockt es in hohen Dosen die DC-Reifung und führt zur Induktion von tolerogenen DCs (TDC, *tolerogenic DC*) [21, 23]. Eine verstärkte Sekretion von IL-10 durch DCs als Reaktion auf LPS konnte auch in den Arbeiten von Dowling *et al.*, Dearman *et al.* sowie bei Jung *et al.* bei murinen DCs beobachtet werden [34, 35, 300]. Interessanterweise wurde von den Autoren Means *et al.*, Thoma-Uszynski *et al.* sowie von Chamorro *et al.* für humane DCs Gegenteiliges beschrieben [10, 296, 301]. Hierbei detektierte die Arbeitsgruppe Means *et al.* weder eine verstärkte Expression der *IL-10*-mRNA noch des IL-10-Proteins nach LPS-Stimulation der DCs [10]. Auch bei Chamorro *et al.* ließen sich bei LPS-DCs im Vergleich zu TDCs signifikant geringere Mengen des IL-10-Proteins messen [296]. Bei Thoma-Uszynski *et al.* führte die LPS-Stimulation der DCs im Vergleich zu Monozyten zur verminderten Sekretion von IL-10, bei gleichzeitig verstärkter IL-12-Freisetzung [301]. Die Diskrepanz der Ergebnisse der vorliegenden Dissertation und den genannten Arbeiten könnte auf zell-, spezies- oder versuchsabhängigen Unterschieden basieren. Zudem wurden von Means *et al.* sowie von Thoma-Uszynski *et al.* höhere Konzentrationen an LPS (50 bis 100ng/ml) eingesetzt.

Die Stimulation der DCs mit Flagellin führte im Vergleich zur Kontrolle zu einer verstärkten Sekretion von TNF, IL-6 und IL-8, allerdings in deutlich geringerem Ausmaß als unter LPS-Einfluss. Diese Ergebnisse konnten ebenso in mehreren Arbeiten beobachtet werden [10, 34, 262, 302]. Allerdings zeigten sich bei den Untersuchungen von Mäkelä *et al.*, Dearman *et al.* sowie von Watanabe *et al.* keine Veränderungen bezüglich der Freisetzung von TNF und IL-6 durch DCs, die mit Flagellin stimuliert wurden [35, 303, 304]. Hierbei sollte jedoch er-

wähnt werden, dass bei den Versuchen von Dearman *et al.* und Watanabe *et al.* murine DCs untersucht wurden und bei den drei genannten Arbeiten die DCs mit deutlich höheren Konzentrationen an Flagellin (500ng/ml bis zu 1µg/ml) inkubiert wurden. Die Exposition der DCs zu Flagellin ergab hinsichtlich der Freisetzung von IL-1β und IL-23 in der vorliegenden Dissertation keine Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle, was in Übereinstimmung mit den Angaben der Literatur steht [35, 262, 302, 304]. Interessanterweise sezernierten CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> DCs der Lamina propria (LP-DC) von Mäusen, im Gegensatz zu Monozyten-abstammenden CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> LP-DCs, nach Flagellin-Stimulation vermehrt IL-23, wie es von Kinnebrew *et al.* veranschaulicht wurde [305].

Flagellin zeigte in der vorliegenden Arbeit im Hinblick auf die Sekretion von IL-12 und von IL-10 im Vergleich zur Kontrolle keinen Einfluss auf die DCs. Dieselben Ergebnisse lassen sich ebenfalls in den Arbeiten von Means *et al.*, Dowling *et al.*, Dearman *et al.* und Mäkelä *et al.* wiederfinden [10, 34, 35, 304]. Im Gegensatz dazu führte die Aktivierung des „Toll-like“-Rezeptors (TLR) 5 über Flagellin in Mausmodellen von Vicente-Suarez *et al.* sowohl bei immunogenen DCs, Makrophagen als auch bei TDCs zu einer verstärkten IL-12- und verminderten IL-10-Sekretion. Dies induzierte die Differenzierung von naiven T-Zellen zu T<sub>H</sub>1-Zellen [306, 307]. Demgegenüber stehen die Ergebnisse aus den Arbeiten von Vijay-Kumar *et al.*, die bei TLR5-Knockout-Mäusen, nach Flagellin-Stimulation, signifikant verstärkte Mengen an proinflammatorischen Zytokinen wie TNF, IL-1β, IL-12, IL-23 und IL-17 detektierten konnten und die Mäuse daraufhin eine spontane Kolitis entwickelten. Daraus lässt sich ableiten, dass Flagellin bzw. TLR5 die Mäuse vor der Entstehung und Verschlimmerung von spontanen oder bakteriellen Darmentzündungen schützt, indem es die Sekretion proinflammatorischer Zytokine inhibiert [262, 263].

Die Inkubation der DCs mit MDP führte in der vorliegenden Arbeit zu keiner Veränderung der Sekretion von IL-1β, TNF, IL-23 sowie von IL-12 und IL-10, wie es in der Literatur in Tier- und Humanmodellen einheitlich von mehreren Autoren beschrieben wurde [17, 282, 303, 308-310]. Im Gegensatz dazu beeinflusste MDP die DCs hinsichtlich der Sekretion von IL-6 und IL-8, welche im Vergleich zu iDCs signifikant vermehrt von den MDP-stimulierten DCs (MDP-DC) freigesetzt wurden. Fritz *et al.* sowie Magelhaes *et al.* konnten in ihren Arbeiten allerdings keine verstärkte Freisetzung von IL-6 durch MDP-DCs nachweisen. Die Diskrepanz der Ergebnisse lässt sich möglicherweise drauf zurückzuführen, dass bei der Stimulation der DCs in den genannten Arbeiten andere Mengen an MDP (50 ng/ml und 125 ng/ml) eingesetzt und bei Magelhaes *et al.* murine DCs untersucht wurden [17, 309]. Interessanterweise beschrieben Todate *et al.* und Fujimura *et al.*, dass die Stimulation von Monozyten-abstammenden DCs (moDCs) mit MDP-Lys (L18), einem synthetischen MDP-Analogon, zur suffizienten Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine TNF, IL-6, IL-8, IL-12 und IL-10 sowie zur Hochregulation der Reifungsmarker CD80, CD83 und CD86 aus den DCs führte. Demzufolge zeigte das synthetisierte MDP-Lys eine weitaus stimulierendere Wirkung auf die DCs als das konventionelle MDP [311, 312], wie es auch schon von Tsubura *et al.* und Moroi *et al.* beschrieben wurde [313, 314]. Sowohl Tada *et al.*, van Heel *et al.* als auch Todate *et al.* beobachteten ebenfalls eine verstärkte Sekretion von IL-8 bei der Stimulation von DCs mit

MDP [282, 310, 311]. Van Heel *et al.* vermuteten bezüglich der verstärkten IL-8-Sekretion nach MDP-Einfluss eine wichtige Rolle von IL-8 in der Pathogenese von Morbus Crohn. Die Aktivierung von NOD2 (*nucleotide-binding oligomerisation domain-containing protein 2*) über MDP führte in deren Arbeit zwar zur erhöhten IL-8-Sekretion, jedoch nur zur Freisetzung von geringen Mengen an TNF und IL-1 $\beta$ , welche erst bei Kombination von MDP mit LPS bzw. Flagellin deutlich verstärkt von den DCs sezerniert wurden. Demnach induzierte die alleinige MDP-Stimulation hierbei eine Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten, allerdings keine generalisierte Immunantwort [310].

Bei den Kombinationen von LPS mit MDP bzw. Flagellin ergaben sich hinsichtlich der Freisetzung von IL-1 $\beta$ , TNF, IL-6 und IL-8 durch die DCs in der vorliegenden Dissertation keine Unterschiede im Vergleich zur alleinigen LPS-Stimulation. Dies steht den Angaben von Traub *et al.*, Wolfert *et al.*, Fritz *et al.* sowie von Magelhaes *et al.* gegenüber, die einen synergistischen Effekt von MDP und LPS auf die Sekretion der genannten Zytokine postulierten [17, 308, 309, 315]. In der Arbeit von Magelhaes *et al.* wurde hierbei eindeutig MDP für den Synergismus von LPS und MDP verantwortlich gemacht, da bei Mutationen von NOD2 die genannten Zytokine deutlich vermindert von murinen DCs freigesetzt wurden [309]. Allerdings wurde in der vorliegenden Dissertation im Vergleich zu den genannten Arbeiten eine höhere LPS-Konzentration von 10 ng/ml (im Vgl. zu 0,04 bis 1 ng/ml) zur Stimulation der DCs eingesetzt. Da diese Menge an LPS die Freisetzung von IL-1 $\beta$ , TNF, IL-6 und von IL-8 bereits stark induziert, bewirkt eine zusätzliche Gabe von MDP möglicherweise keine zusätzliche Verstärkung der Sekretion. Zudem wurden in den genannten Arbeiten unterschiedliche MDP-Konzentrationen (von 10 ng/ml bis zu 100  $\mu$ g/ml) sowie murine DCs eingesetzt und verschiedene Differenzierungs- und Inkubationsschemata angewendet, wodurch die Vergleichbarkeit eingeschränkt ist.

In der vorliegenden Arbeit ließ sich allerdings der synergistische Effekt von MDP und LPS auf die DCs hinsichtlich der verstärkten Sekretion der Zytokine IL-12, IL-23 und IL-10, die maßgeblich an der Generierung der T-Zellantwort beteiligt sind, beobachten. Dies entspricht den allgemeinen Angaben, die in der Literatur zu finden sind [17, 282, 303, 308, 309]. Interessanterweise zeigten Watanabe *et al.*, dass eine Vorstimulation von humanen DCs mit MDP in einer gewissen Toleranz gegenüber proinflammatorischen Stimuli, insbesondere LPS, resultierte, was eine verminderte Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IL-6, IL-12 und TNF zur Folge und die synergistische Wirkung von LPS und MDP aufgehoben hatte. Diesen Effekt übte MDP hierbei über die Aktivierung von NOD2 aus, worüber die Expression von IRF-4 (*interferon regulatory factor-4*), einem Inhibitor der TLR-Signalwege [316, 317], induziert wurde. Zudem kam es bei der Vorstimulation von murinen DCs mit MDP bei NOD2-Defizienz zu keiner Verminderung der Zytokinsekretion, was die regulatorische Funktion von MDP bzw. NOD2 unterstreicht [303]. Demzufolge wäre es interessant, in zukünftigen Versuchen die DCs mit MDP vorzustimulieren, erst im Verlauf die anderen bakteriellen Stimuli hinzuzufügen und dann deren Einfluss auf die Zytokinsekretion der DCs zu analysieren. Die Kombination aus Flagellin und LPS zeigte in den Versuchen der vorliegenden Dissertation keine synergistischen Einflüsse auf die Sekretion der genannten

Zytokine. Dies wurde unter anderem von Mäkelä *et al.* für die Zytokine IL-6, IL-12, IL-10, TNF und IL-10 bestätigt [304].

### 6.1.3 Genexpression von bakteriellen Rezeptoren in dendritischen Zellen

DCs exprimieren zur Detektion von PAMPs (*pathogen-associated molecular pattern*) sowohl extra- als auch intrazellulär lokalisierte sogenannte Mustererkennungsrezeptoren (PRR, *pattern recognition receptor*) (siehe auch Kapitel 1.2.2). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der bakteriellen Komponenten LPS, Flagellin und MDP sowie deren Kombinationen auf die mRNA-Expression von *NOD2*, dem „Autophagie-ähnlichen Protein 16-1“ (*ATG16L1*, *autophagy-related protein 16-1*), von *NALP3* (*NACHT*, *leucin-rich-region-, pyrin-domain-containing protein 3*) sowie von *TLR4* und *TLR5* analysiert.

Auch ohne die Präsenz von bakteriellen Stimuli ließ sich ein gewisser Level an *NOD2*-mRNA in den unreifen DCs detektieren. Die mRNA-Expression von *NOD2* wurde hierbei durch die Stimulation der DCs mit den verschiedenen bakteriellen Komponenten und deren Kombinationen nicht wesentlich verändert. Fritz *et al.*, Cooney *et al.* und Gutierrez *et al.* zeigten, dass sowohl unreife als auch reife DCs sowie moDCs im Allgemeinen, im Vergleich zu T- und B-Lymphozyten sowie Epithelzellen, deutlich höhere Mengen an *NOD2* exprimieren [17, 45, 47]. In Untersuchungen von Begue *et al.* zeigte sich, dass die direkte Stimulation von humanen intestinalen Epithelzellen (IEC, *intestinal epithelial cell*) mit TLR-Liganden, unter anderem mit LPS, keine Veränderung hinsichtlich der mRNA-Expression von *NOD2* bewirkte. Allerdings ließ sich in der genannten Arbeit nach Flagellin-Stimulation eine verstärkte Expression von *CARD15* in den IECs beobachten [318]. Beschreibungen von Rosenstiel *et al.* zufolge führte die Stimulation mit TNF vor allem in Kombination mit Interferon (IFN)  $\gamma$  zur verstärkten *NOD2*-mRNA-Expression in humanen IECs [319]. Billmann-Born *et al.* beobachteten nach Stimulation von HEK 293 Epithelzellen mit MDP nach 2h eine verstärkte und nach 6h eine regrediente *NOD2*-mRNA-Expression. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass DCs *NOD2* zur optimalen Detektion von bakteriellen Antigenen in so hohem Maße exprimieren, dass eine Regulation nicht nötig ist, wohingegen epitheliale Zellen erst auf den Stimulus MDP dessen Rezeptor hochregulieren. Zudem sei zu erwähnen, dass bei den genannten Arbeiten im Vergleich zur vorliegenden Dissertation andere Versuchsbedingungen herrschten sowie unterschiedliche Zelltypen eingesetzt wurden, wodurch die Vergleichbarkeit eingeschränkt ist.

In der vorliegenden Arbeit regulierten sowohl LPS als auch gleichermaßen die Kombinationen von LPS mit Flagellin bzw. MDP die mRNA-Expression von *TLR4* im Vergleich zu iDCs nach insgesamt 48h signifikant nach unten. *TLR4* wird in humanen iDCs exprimiert [282, 320] und nach Stimulation mit LPS kurzfristig hochreguliert, wobei nach ca. fünf Stunden eine verminderte, dennoch eine im Vergleich zum Beginn immer noch höhere Expression von *TLR4* in den DCs zu beobachten war, wie es von Visintin *et al.* und Kobayashi *et al.* beschrieben wurde. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit den Ergebnissen der vorliegenden Dissertation. Somit sinkt die Sensibilität der Zellen auf eine nachfolgende LPS-Stimulation im Sinne einer „Feedback“-Regulation, um einer übermäßigen Immunantwort vorzubeugen [8, 321]. Flagellin und MDP zeigten keinerlei Einfluss auf die mRNA-Expression

von *TLR4*. Von Wiken *et al.* konnte bei humanen peripheren Blut-Monozyten von gesunden Spendern eine verminderte *TLR4*-Expression nach MDP-Stimulation im Vergleich zur Kontrolle beobachten [322]. Allerdings wurde hierbei eine wesentlich höhere MDP-Konzentration von 2 µg/ml eingesetzt und Monozyten statt DCs untersucht, was die divergierenden Ergebnissen erklären könnte. Interessanterweise exprimieren humane IECs hohe mRNA-Level von *TLR4*, was sich allerdings nicht auf Proteinebene widerspiegelt. Daraus resultiert eine geringe Ansprechrate der IECs auf LPS, was höchstwahrscheinlich vor einer pathologischen Entzündungsreaktion auf die normale Darmflora schützen und die Darmhomöostase aufrechterhalten soll [323, 324].

Sowohl LPS als auch Flagellin sowie ihre Kombinationen führten im Vergleich zur Kontrolle in den Versuchen der vorliegenden Dissertation zur signifikant verminderten *TLR5*-mRNA-Expression in den DCs, wobei MDP keinen Einfluss auf die Expression von *TLR5* zeigte. Demzufolge exprimierten die unreifen DCs einen gewissen Level an *TLR5*-mRNA, was die Arbeitsgruppe von Means *et al.* ebenfalls zeigte [10]. Bei Untersuchungen von Kwon *et al.* veränderte weder die Präsenz von LPS noch die von Flagellin die *TLR5*-mRNA-Expression auf Pferdemonozyten [325]. Demgegenüber steht, dass humane Monozyten von gesunden Spendern im Vergleich zu Crohn-Patienten nach LPS-Stimulation eine deutlich höhere *TLR5*-mRNA-Expression aufwiesen [326].

Bei Visintin *et al.* führte die Stimulation von humanen iDCs mit LPS zur verminderten Expression von *TLR5* auf Proteinebene [8]. Insgesamt lassen sich in der Literatur nur vereinzelt Arbeiten finden, welche humane DCs hinsichtlich der mRNA-Expression von *TLR5* nach Inkubation mit LPS, Flagellin oder MDP sowie deren Kombinationen untersuchten. Daher erscheint es umso interessanter, dass sowohl Flagellin als auch LPS Einfluss auf die mRNA-Expression von *TLR5* in den DCs zeigten. Die Herabregulation von *TLR5* unter LPS- und Flagellin-Einfluss hat möglicherweise eine verminderte Sensibilität der DCs auf weitere Flagellin-Einflüsse zum Ziel, um im Sinne der Aufrechterhaltung der Immunhomöostase, eine überschießende Entzündungsantwort zu verhindern.

Die *NALP3*-mRNA-Expression wurde insbesondere durch die Stimulation der DCs mit LPS und den Kombinationen von LPS mit Flagellin bzw. MDP beeinflusst. Die Inkubation mit LPS und deren Kombinationen führte im Vergleich zur Kontrolle zur signifikant verminderten mRNA-Expression von *NALP3*. Diese Beobachtungen stehen den Ergebnissen von Ganz *et al.* gegenüber. Hier induzierte LPS eine verstärkte Expression der *NALP3*-mRNA in murinen Leberzellen und führte über die Aktivierung des *NALP3*-Inflammasoms zur vermehrten Freisetzung von TNF, IL-1 $\beta$  und IL-18, was eine Destruktion der Leber zu Folge hatte [327]. Da in den genannten Arbeiten allerdings murine und nicht humane DCs verwendet und zudem abweichende LPS-Konzentrationen eingesetzt wurden, kann dies mit den Ergebnissen dieser Dissertation nur eingeschränkt verglichen werden. Obwohl die mRNA-Expression von *NALP3* durch LPS signifikant vermindert wurde, führte die Stimulation der DCs mit LPS in der vorliegenden Arbeit zu einer verstärkten Sekretion des für *NALP3* typischen Zytokins IL-1 $\beta$  (siehe Kapitel 5.2.1). Daher scheint die beobachtete verstärkte IL-1 $\beta$ -Produktion von LPS-DCs in Unabhängigkeit von *NALP3* zu erfolgen. Zudem wurde auch von Martinon *et al.* be-

schrieben, dass LPS die Reifung von pro-IL-1 $\beta$  zu IL-1 $\beta$  NALP3-unabhängig induziert [43]. Im Gegensatz zu LPS zeigten weder Flagellin noch MDP im Vergleich zur Kontrolle einen Einfluss auf die mRNA-Expression von *NALP3*, wobei erwähnt werden sollte, dass Flagellin und MDP im Vergleich zur Kontrolle auch keine Veränderungen hinsichtlich der Freisetzung von IL-1 $\beta$  bewirkten.

Die mRNA-Expression von *ATG16L1* ließ sich schon in unstimulierten DCs detektieren, wobei das Ausmaß der Expression durch keine der untersuchten bakteriellen Komponenten oder deren Kombinationen beeinflusst wurde. In Untersuchungen von murinen und humanen Makrophagen bei Xu *et al.* sowie von humanen DCs bei Cooney *et al.* ließen sich bei Stimulation der Zellen mit LPS deutlich ansteigende Mengen an Autophagosomen in den Zellen detektieren [47, 328]. Nach Meinung von Saitoh *et al.* ist ATG16L1 für die Regulation der LPS-induzierten Inflammasom- und Autophagosom-Aktivität in Mäusen verantwortlich. Hierbei beobachteten Saitoh *et al.*, dass sowohl die Autophagosomenformation als auch die Degradierung von langlebigen Peptiden bei ATG16L1-defizienten Mäusen gestört war und ATG16L1-defiziente Mausmakrophagen nach Stimulation mit LPS deutlich höhere Mengen der proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$  und IL-18 produzierten [329]. Darüber hinaus wurde von Cooney *et al.* und Brain *et al.* beschrieben, dass MDP in Abhängigkeit von ATG5, ATG7 und ATG16L1 die Autophagozytose in humanen DCs induziert und durch die Induktion einer verstärkten Expression von MHC-II-Molekülen auf den DCs, Einfluss auf deren Antigenpräsentationskapazität zeigt [47, 48]. Cooney *et al.* und Homer *et al.* konnten in ihren Versuchen eine verstärkte Akkumulation von Autophagosomen in humanen DCs und humanen Epithelzellen nach MDP-Exposition messen, was beim Vorliegen von NOD2-Mutationen nicht beobachtet werden konnte [47, 255]. Hinsichtlich der Evaluation der Gründe für die Diskrepanzen der Ergebnisse der vorliegenden Dissertation und den genannten Arbeiten sei zu erwähnen, dass in den genannten Untersuchungen nicht die mRNA-Expression von *ATG16L1*, sondern die Menge an Autophagosomen in den Zellen gemessen wurde, wodurch keine kausalen Schlussfolgerungen hinsichtlich der Regulation der Autophagozytose durch die bakteriellen Bestandteile gemacht werden können. Möglicherweise findet die Regulation von ATG16L1 über MDP nicht auf mRNA-Ebene statt. Zudem wurden in den genannten Arbeiten höhere LPS-Konzentrationen (100 ng/ml bis 1  $\mu$ g/ml) sowie weitaus höhere MDP-Konzentrationen (1-10  $\mu$ g/ml) eingesetzt und bei Xu *et al.* und Saitoh *et al.* außerdem andere Zelltypen verwendet [47, 48, 255, 328, 329].

#### **6.1.4 Genexpression von Komponenten des Tryptophanstoffwechsels in dendritischen Zellen**

Die Indolamin-2,3-dihydrogenase (IDO) katalysiert den Abbau der essentiellen Aminosäure Tryptophan zu Kynurenin. Diese Reaktion wirkt suppressiv auf die Proliferation von Effektor-T-Zellen und reguliert das Ausmaß der Immunantwort, da Tryptophan essentiell für die Funktion von Effektor-T-Zellen ist und durch den Abbau zu Kynurenin über IDO den Zellen nicht mehr zur Verfügung steht [53, 90-93, 99]. IDO wird hierbei in Abhängigkeit des intrazellulären Arylhydrocarbonrezeptors (AHR) in DCs hochreguliert [110-112]. Die Bindung von



Kynurenin an den Rezeptor führt zur Aktivierung von AHR und induziert die Bildung von regulatorischen T-Zellen (Treg). Auch Kynurenin selbst wirkt zudem immunsuppressiv [90, 105-110].

In den Versuchen der vorliegenden Arbeit führte die Stimulation der DCs mit LPS, Flagellin sowie deren Kombinationen zur verstärkten Expression der mRNA von *IDO1*, *IDO2* und *AHR*, wobei LPS im Vergleich zu Flagellin eine weitaus höhere Expression der genannten Gene induzierte. MDP zeigte im Vergleich zur Kontrolle keinen Einfluss auf die mRNA-Expression von *IDO1*, *IDO2* und *AHR*. Untersuchungen von Jung *et al.*, Popov *et al.*, Nguyen *et al.* sowie von Hill *et al.* bestätigen einheitlich den verstärkenden Effekt von LPS auf die *IDO*-Expression, wobei in den genannten Arbeiten vor allem BMDCs (*bone marrow-derived dendritic cell*) eingesetzt wurden [98, 110, 300, 330]. Mahanonda *et al.* beobachtete eine verstärkte *IDO*-Expression nach Flagellin-Stimulation in humanen Gingiva-Fibroblasten, wobei zu erwähnen ist, dass eine andere Zellspezies und eine höhere Flagellinkonzentration von 5 µg/ml verwendet wurde, allerdings das Ergebnis mit dem der vorliegenden Arbeit in Übereinstimmung steht [331]. Sowohl bei BMDCs in Untersuchungen von Nguyen *et al.*, sowie bei murinen Makrophagen in Arbeiten von Kimura *et al.* ließen sich eine verstärkte *AHR*-mRNA-Expression nach LPS-Einfluss beobachten [110, 332]. Dass sowohl *IDO1* und *IDO2* als auch *AHR* nach LPS- und Flagellin-Einfluss gleichermaßen verstärkt exprimiert wurden, steht im Einklang mit den Erkenntnissen von Vogel *et al.*, Jux *et al.* sowie von Nguyen *et al.*, dass die Expression von *IDO* in Abhängigkeit der Expression von *AHR* erfolgt [110-112].

Demzufolge scheinen proinflammatorische Stimuli wie LPS durch die Hochregulation der mRNA von *IDO1*, *IDO2* und *AHR* in DCs einer überschießenden Immunantwort entgegenwirken zu wollen. Allerdings wurde von Huttunen *et al.*, Ploder *et al.* und Pellegrin *et al.* in diesem Zusammenhang beschrieben, dass bei Trauma-Patienten und Patienten mit bakteriämischer Sepsis eine im Rahmen der Entzündungsantwort induzierte verstärkte *IDO*-Aktivität in Assoziation mit reduzierten Überlebensraten zu beobachten war. Hierbei ließen sich bei nicht überlebenden Patienten bzw. denen, die nach Trauma ein akutes Lungenversagen (ARDS, *acute respiratory distress syndrom*), ein Multiorganversagen (MODS, *multiple organ dysfunction syndrom*) oder eine bakteriämische Sepsis entwickelten, deutlich verminderte Tryptophanlevel als Folge der verstärkten *IDO*-Aktivität detektieren [333-335]. Die Ergebnisse dieser Arbeiten stehen in Kongruenz mit Beobachtungen von Landfried *et al.*, wobei erhöhte Kynurenin-Level und eine verstärkte *IDO*-mRNA-Expression in Darmbiopsien von Patienten mit schwerer GvHD gemessen werden konnten [270]. Daher lässt sich schlussfolgern, dass zwar *IDO* im Rahmen der Entzündungsantwort zum Erhalt der Immunhomöostase reaktiv verstärkt exprimiert wird, allerdings die immunsuppressiven den übermäßigen immunstimulatorischen Effekten deutlich unterlegen sind und so eine unkontrollierte proinflammatorische Immunantwort die Folge ist.

### 6.1.5 Genexpression von Enzymen des Vitamin D<sub>3</sub>- und Vitamin A-Stoffwechsels in dendritischen Zellen

Der aktive Metabolit des Vitamin D<sub>3</sub>-Stoffwechsels 1,25-Dihydroxy-Vitamin D<sub>3</sub> (1,25(OH)<sub>2</sub>-VD<sub>3</sub>), besitzt durch die Modulation der Immunantwort eine insgesamt immunsupprimierende Wirkung. 1,25(OH)<sub>2</sub>-VD<sub>3</sub> induziert hierbei die Bildung von T<sub>H</sub>2-Zellen und Tregs bei gleichzeitiger Inhibition der Differenzierung von proinflammatorischen T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>17-Zellen und bewirkt die Bildung von TDCs [158, 167-170]. Von besonderer Bedeutung ist die Tatsache, dass DCs selbst in der Lage sind, durch den Besitz von sowohl Sterol-27-Hydroxylase (CYP27A1) und 25-Hydroxycholesterol-1- $\alpha$ -Hydroxylase (CYP27B1), 1,25(OH)<sub>2</sub>-VD<sub>3</sub> zu bilden [152-154].

In den Versuchen der vorliegenden Arbeit führte die Inkubation der DCs sowohl mit LPS, Flagellin, als auch mit deren Kombinationen zu einer signifikant verstärkten mRNA-Expression von *CYP27B1*. Dies steht in Einklang mit Untersuchungen von humanen DCs bei Fritsche *et al.* und Jeffery *et al.*, von murinen DCs bei Entioutina *et al.* sowie von Monozyten bei Adams *et al.*, die einheitlich eine verstärkte Expression des Enzyms in den Zellen nach LPS-Stimulation beobachteten [153, 160, 161, 336]. Wie schon in Kapitel 1.2.4.3 beschrieben, sind DCs durch die Hochregulation von *CYP27B1* in der Lage, vermehrt 1,25(OH)<sub>2</sub>-VD<sub>3</sub> zu bilden, um über parakrine Sekretion des Vitamins die Differenzierung ihrer Vorläufer zu inhibieren und so das Ausmaß der Entzündungsreaktion zu regulieren [153, 154, 160, 161]. Da sowohl LPS-DCs als auch Flag-DCs, trotz der signifikant verstärkten Expression von *CYP27B1*, in hohen Konzentrationen die allogene T-Zellproliferation bei Anwesenheit von 25-Hydroxy-Vitamin D<sub>3</sub> (25(OH)-VD<sub>3</sub>) kaum beeinflussten, würde es sich daher anbieten, in zukünftigen Versuchen in den Überständen der DCs die Konzentration des aktiven Metaboliten 1,25(OH)<sub>2</sub>-VD<sub>3</sub> zu messen.

MDP zeigte keinen Einfluss auf die Expression des Vitamin-D<sub>3</sub>-metabolisierenden Enzyms. In diesem Zusammenhang wurde interessanterweise von Wang *et al.* beschrieben, dass die *NOD2*-mRNA-Expression nach Exposition mit 1,25(OH)<sub>2</sub>-VD<sub>3</sub> in humanen Monozyten verstärkt induziert wurde [337]. Möglicherweise hat zwar 1,25(OH)<sub>2</sub>-VD<sub>3</sub> Einfluss auf die Regulation der *NOD2*-mRNA-Expression, allerdings hat die Aktivierung von NOD2 über MDP keinen Effekt auf die Expression von *CYP27B1*. Der genaue Zusammenhang müsste in zukünftigen Experimenten evaluiert werden und vor allem nicht Monozyten, sondern DCs eingesetzt werden, da 1,25(OH)<sub>2</sub>-VD<sub>3</sub> die beiden Zelltypen in ihrer Funktion unterschiedlich beeinflusst. Zum einen induziert 1,25(OH)<sub>2</sub>-VD<sub>3</sub> die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen und stimuliert deren Phagozytosekapazität [166, 167], zum anderen werden DCs durch 1,25(OH)<sub>2</sub>-VD<sub>3</sub> in ihrer Antigenpräsentationsfähigkeit inhibiert [158, 159].

Retinsäure als aktiver Metabolit des Vitamin A-Stoffwechsels hat, neben vielen anderen Funktionen im menschlichen Körper, ebenso wie Vitamin D<sub>3</sub>, eine Vielzahl an immunregulatorischen Aufgaben. Hierbei steht vor allem die Induktion der Tregs und des „Homing“ von Immunzellen in den Darm im Vordergrund, dem eine Aufrechterhaltung der Darmhomöostase zu Grunde liegt [127-137]. Ebenso wie Vitamin D<sub>3</sub>, induziert Retinsäure die Bildung von T<sub>H</sub>2-Zellen, bei gleichzeitiger Inhibition der Differenzierung von T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>17-Zellen [138-

141]. Die metabolisierenden Enzyme ALDH1A1-3 (Aldehyd-Dehydrogenase 1A) sind für die Entstehung der Retinsäure aus Retinal verantwortlich [119, 120].

Die Stimulation der DCs mit den bakteriellen Bestandteilen zeigte in der vorliegenden Dissertation unterschiedliche Einflüsse auf die mRNA-Expression von *ALDH1A1-3*. LPS bewirkte eine verminderte mRNA-Expression von *ALDH1A1* und *ALDH1A3*, wobei es keinen Effekt auf die Expression von *ALDH1A2* zeigte. Die Inkubation der DCs mit Flagellin führte ebenfalls zur verminderten Expression von *ALDH1A1* und zur geringfügig verstärkten Expression von *ALDH1A3*, wobei auch Flagellin keinen Einfluss auf die Expression von *ALDH1A2* zeigte. MDP hatte in Vergleich zur Kontrolle keinerlei Einfluss auf die Genexpression der drei Enzyme. Martinelli *et al.* detektierten eine Expression von *Aldh1A1* und *Aldh1A2*, jedoch nicht von *Aldh1A3* auf Proteinebene in unreifen humanen moDCs [338]. Die untersuchten iDCs der vorliegenden Arbeit exprimierten allerdings die mRNA aller drei Enzyme. Demzufolge werden möglicherweise die mRNA-Expression und letztlich die Umsetzung in das Protein unterschiedlich reguliert. In Versuchen von Manicassamy *et al.* exprimierten unreife murine Milz-DCs keines der drei genannten Enzyme, wobei auch die Stimulation der DCs mit LPS das Ausmaß der Expression nicht wesentlich veränderte, was den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit widerspricht. Lediglich die Stimulation mit Zymosan führte zur Hochregulation der *Aldh1A2*-mRNA in den Zellen [339]. Im Gegensatz dazu exprimierten im Mausmodell MLN-DCs verstärkt *Aldh1A2*, sowie IECs und PP-DCs vor allem *Aldh1A1*, wobei *Aldh1A3* von allen Zellen in nur geringem Ausmaß exprimiert wurde [122-124]. Yokota *et al.* beschrieben, dass murine BMDCs, die mit GM-CSF- (*granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor*) und IL-4 generiert wurden, unter sterilen Bedingungen eine verstärkte Expression von *Aldh1A2* aufwiesen. Gerade die Kombination aus GM-CSF und IL-4 zeigte synergistische Auswirkungen hinsichtlich der *Aldh1A2*-mRNA-Expression. Dieser Effekt wurde durch die Inkubation der Zellen mit LPS sowie mit Retinsäure (RA, *retinoic acid*) weiter verstärkt, was sich in der vorliegenden Arbeit allerdings nicht bestätigen ließ [340]. Uematsu *et al.* zeigten, dass die Stimulation mit Flagellin, im Gegensatz zu der mit LPS, zur verstärkten *Aldh1A2*-Expression in murinen LP-DCs führte und dies die Generierung von T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>17-Zellen sowie von IgA-produzierenden B-Zellen induzierte [341]. Ferner veranschaulichten Feng *et al.* in ihrer Arbeit, dass murine BMDCs auf die Stimulation mit sowohl LPS als auch Flagellin mit der Hochregulation von *Aldh1A2*-mRNA reagierten, wobei der Effekt durch die zusätzliche Gabe von RA deutlich amplifiziert wurde [342]. Die Diskrepanz der Ergebnisse der vorliegenden Dissertation und den genannten Arbeiten lässt sich möglicherweise auf die Verwendung von murinen DCs sowie den Einsatz von höheren Konzentrationen an LPS und Flagellin von jeweils 1 µg/ml zurückführen. Zudem zeigen die unterschiedlichen Ergebnisse, dass die ALDH1A-Expression sehr gewebe- und speziesabhängig reguliert wird.

Interessanterweise führte in der vorliegenden Arbeit die Stimulation der DCs mit der Kombination aus LPS und Flagellin bzw. MDP zur signifikant verstärkten Expression von *ALDH1A1* und bei der Kombination von LPS und MDP zudem von *ALDH1A2*, was dem Stand der Literatur zufolge, in der vorliegenden Dissertation in dieser Form erstmalig bei humanen moDCs untersucht und beobachtet wurde.

### 6.1.6 Einfluss von dendritischen Zellen auf die Induktion der allogenen T-Zellantwort

Allogene Spender-T-Lymphozyten erkennen im Rahmen der allogenen SZT bzw. der GvHD die MHC-Moleküle von Empfängerzellen als fremd, was zur Aktivierung, Proliferation und Differenzierung der naiven allogenen T-Zellen führt. Hinzu kommt, dass die DCs durch bakterielle Bestandteile, die durch eine geschädigte Epithelbarriere in das Gewebe gelangt sind, aktiviert werden und durch die Expression von kostimulatorischen Molekülen und die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen die allogene T-Zellantwort zusätzlich verstärken [204, 208-210]. Das Ausmaß dieser Alloreaktion wurde in der vorliegenden Arbeit anhand der Messung der Proliferation von allogenen T-Zellen mittels „MLR“ (*mixed lymphocyte reaction*) analysiert. Die DCs, welche mit den unterschiedlichen bakteriellen Komponenten und deren Kombinationen stimuliert wurden, sind hierbei in absteigender Konzentration mit einer konstanten Anzahl an naiven allogenen T-Zellen inkubiert und der Einfluss dieser DCs auf die T-Zellproliferation untersucht worden. In Kokultur mit aufgereinigten allogenen konventionellen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen wurde analysiert, welche Art der T-Zellantwort nach Inkubation mit den stimulierten DCs induziert wurde. Die jeweiligen T-Zell-Subpopulationen wurden anhand der Messung typischer intrazellulärer Zytokine IFN- $\gamma$  und IL-2 (T<sub>H</sub>1), IL-4 (T<sub>H</sub>2) sowie des Transkriptionsfaktors FoxP3 (*forkhead-box-protein 3*) (Treg) charakterisiert. Entsprechend ihres Phänotyps induzierten LPS-DCs, unabhängig vom DC-T-Zell-Verhältnis, im Vergleich zu allen anderen Ansätzen eine deutlich verstärkte Proliferation der allogenen T-Lymphozyten. Diese Beobachtung lässt sich anhand der signifikant verstärkten Hochregulation der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86, sowie der Expression von CD83, HLA-DR und  $\beta_2$ M begründen (siehe Kapitel 6.1.1). Zudem sezernierten die LPS-DCs in der vorliegenden Dissertation erhöhte Mengen an proinflammatorischen Zytokinen wie IL-6, IL-23 und IL-12 (siehe Kapitel 6.1.2), was zur Bildung von signifikant verstärkten Mengen an allogenen IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> T-Zellen führte. Diese Ergebnisse decken sich einheitlich mit den Ergebnissen aus Arbeiten von Means *et al.*, Chamorro *et al.*, Todate *et al.*, Chan dran *et al.* sowie von Visintin *et al.*, die eine verstärkte Proliferation von allogenen T-Zellen, insbesondere von IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> T-Zellen, nach Inkubation mit murinen bzw. humanen LPS-DCs beobachten konnten [8, 10, 296, 311, 343]. Im Gegensatz zu TDC, die die Bildung von Tregs im Sinne einer Immunsuppression induzieren [20-23], liegt die Aufgabe von immunogenen DCs, wie u.a. LPS-DCs, in der Abwehr und Elimination von Pathogenen und somit in der Induktion einer proinflammatorischen Immunantwort [1, 25]. Demzufolge erscheint es ersichtlich, dass sich in den Ansätzen mit LPS-DCs eine verminderte Anzahl an regulatorischen FoxP3<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zur Kontrolle nachweisen ließ, da diese die proinflammatorische T<sub>H</sub>-1-Antwort inhibieren. Es zeigte sich hingegen kein Effekt von LPS-DCs hinsichtlich der Anzahl von IL-2<sup>+</sup> T-Zellen. IL-2 stellt ein essentielles Zytokin für die Proliferation von Effektor-T-Zellen dar, welches nach Aktivierung der Effektor-T-Zellen freigesetzt wird und zur Hochregulation des IL-2- $\alpha$ - (CD25)-Rezeptor auf den T-Zellen führt. Hierdurch wird die Proliferation der Effektor-T-Zellen im Sinne eines positiven Feedbackmechanismus über auto- und parakrine Wege aufrechterhalten [344-347]. Da LPS-DCs im Allgemeinen eine signifikant verstärkte Proliferation von

allen allogenen T-Zellen in der MLR induzierten, hätten demzufolge in den Ansätzen mit LPS-DCs im Vergleich zur Kontrolle ebenso erhöhte Mengen an IL-2<sup>+</sup> wie auch IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> T-Zellen zu detektieren sein müssen. Da der intrazelluläre Zytokingehalt der allogenen T-Zellen nicht in einem zeitlichen Verlauf, sondern nur zu einem bestimmten Zeitpunkt gemessen wurde, lässt sich daher mutmaßen, dass IL-2 möglicherweise deutlich früher verstärkt von den T-Zellen sezerniert wurde.

Des Weiteren gilt IL-2 auch als Stabilisator der Suppressorfunktion von FoxP3<sup>+</sup> Tregs und garantiert deren Überleben [83-86]. Da IL-2 allerdings nicht von den Tregs selbst sezerniert wird, ist die Stabilität der Tregs von der IL-2-Sekretion der aktivierten Effektor-T-Zellen abhängig und bedarf daher einer engen räumlichen Beziehung der unterschiedlichen T-Zelltypen zueinander [347]. Da Effektor-T-Zellen im Gegensatz zu Tregs IL-2 möglicherweise nicht zum Überleben, sondern nur als Proliferationsreiz benötigen, wären die nicht erhöhten IL-2-Level zum Zeitpunkt der Messung möglicherweise ebenfalls ein Grund für die signifikant verminderte Detektion von FoxP3<sup>+</sup> T-Zellen unter LPS-Einfluss, da ihre Stabilität von IL-2 abhängig ist. Demnach wäre es interessant, in weiteren Versuchen den zeitlichen Verlauf der produzierten intrazellulären Zytokine zu untersuchen, um die Hypothese einer zeitlich versetzten Sekretion von IL-2 und IFN- $\gamma$  durch die T-Zellen möglicherweise zu bestätigen und die Rolle von IL-2 für FoxP3<sup>+</sup> T-Zellen unter LPS-Einfluss zu konkretisieren. Zudem ließ sich, trotz signifikant verstärkt freigesetzter Mengen an IL-10, kein Einfluss von LPS-DCs auf die Bildung von allogenen IL-4<sup>+</sup> T-Lymphozyten in der vorliegenden Arbeit nachweisen. Wie auch schon in Kapitel 1.2.3 beschrieben, hemmt IFN- $\gamma$ , welches im Rahmen der T<sub>H</sub>1-Antwort von den T-Zellen sezerniert wird, die T<sub>H</sub>2-Antwort [3, 53, 66-68]. Da in der vorliegenden Dissertation vorwiegend IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> T-Zellen in der Kokultur mit LPS-DCs induziert wurden, erklärt sich daher am ehesten der beobachtete Einfluss von LPS-DCs auf die allogene T<sub>H</sub>2-Antwort. Des Weiteren ließen sich in den Kokulturen unter LPS-Einfluss keine IL17<sup>+</sup> T-Zellen detektieren, obwohl LPS-DCs signifikant verstärkt IL-6 und IL-23 sezernierten, die an der Generierung einer T<sub>H</sub>17-Antwort beteiligt sind [72-76]. Allerdings geschieht dies nach Angaben von Weaver *et al.* nur in Abwesenheit von T<sub>H</sub>1- oder T<sub>H</sub>2- polarisierenden Zytokinen [67], wobei in der vorliegenden Arbeit signifikant verstärkte Mengen an IL-12 und IL-10 von LPS-DCs sezerniert wurden. Da auch die Anwesenheit von TGF- $\beta$  zusammen mit IL-6 für die Induktion der T<sub>H</sub>17-Antwort nötig ist [67], wäre es interessant, in zukünftigen Arbeiten die Zytokin-konzentration von TGF- $\beta$  in den Überständen der DCs zu messen, da dies möglicherweise zu wenig von den DCs freigesetzt wurde und somit erst gar keine T<sub>H</sub>17-Zellen induziert werden konnten.

Die Stimulation der DCs mit Flagellin (Flag-DC) zeigte in der vorliegenden Dissertation im Vergleich zur Kontrolle keinen Einfluss auf die allogene T-Zellproliferation und -differenzierung. Dies lässt sich möglicherweise damit erklären, dass Flagellin zwar die Expression von CD80, nicht aber von CD83 und CD86, verstärkte und die Freisetzung des T-Zellpolarisierenden proinflammatorischen Zytokins IL-12 im Vergleich zur Kontrolle nicht wesentlich beeinflusste. Somit scheint Flagellin in der vorliegenden Arbeit ein nur geringes Potential zur Induktion einer T-Zellantwort zu besitzen. In den Arbeiten von Means *et al.* und

Agrawal *et al.* zeigte sich allerdings ein gegenteiliger Effekt. Hierbei induzierten die Flag-DCs einen ebenso hohen Prozentsatz an allopathen IFN- $\gamma^+$  T-Zellen wie LPS-DCs [10, 348]. Allerdings sezernierten die Flag-DCs bei den Versuchen von Agrawal *et al.* auch wesentlich größere Mengen an IL-12. Die Unterschiede zwischen den Ergebnissen der vorgelegten Dissertation und den genannten Arbeiten lassen sich zudem möglicherweise auf die Verwendung verschiedener Konzentrationen von LPS (0,1 bis 1  $\mu\text{g/ml}$ ) und Flagellin (0,5  $\mu\text{g/ml}$ , 20nM), anderen Inkubationszeiten sowie die Ermittlung des intrazellulären Zytokingehaltes mittels einer anderen Versuchsmethode (ELISA versus Durchflusszytometrie) zurückführen [10, 348]. Hinsichtlich des Einflusses von Flagellin auf die T-Zellantwort lassen sich außerdem widersprüchliche Angaben in der Literatur finden. Einerseits soll Flagellin nach Angaben von Didierlaurent *et al.* bei murinen DCs zu Induktion einer  $T_H2$ -Antwort führen, welche sich durch die Sekretion von IL-4 und IL-13 auszeichnen [349]. Andererseits induzierte die Aktivierung von TLR5 über Flagellin die Generierung einer  $T_H1$ -Antwort, wie es von Manicassamy *et al.* und Agrawal *et al.* beschrieben wurde [25, 348].

In der vorliegenden Arbeit hatten MDP-DCs im Vergleich zur Kontrolle keinen Einfluss auf die allogene T-Zellproliferation. Allerdings ließen sich in den Ansätzen mit MDP-DCs eine signifikant höhere Menge an IFN- $\gamma^+$  T-Zellen nachweisen, obwohl die T-Zell-modulierenden Zytokine, mit Ausnahme von IL-6, durch die MDP-Stimulation der DCs hierbei nicht induziert wurden. Eine verstärkte Induktion von allopathen IFN- $\gamma^+$  T-Zellen durch MDP-DCs ließ sich auch in den Arbeiten von Fujimura *et al.* bestätigen, wobei dort nicht konventionelles MDP, sondern MDP-Lys zur Stimulation der DCs eingesetzt wurde und die IFN- $\gamma$ -Produktion der allopathen T-Zellen vor allem bei Kombination von MDP-Lys und IFN- $\beta$  signifikant verstärkt wurde [312]. Zudem konnte Todate *et al.* bei der Inkubation von allopathen T-Zellen mit DCs, die mit MDP-Lys (L18) stimuliert wurden (MDP-Lys-DC), eine ähnlich starke Induktion der allopathen T-Zellproliferation wie bei Inkubation der Zellen mit LPS-DCs beobachten [311]. Demgegenüber stehen die Arbeiten von Tada *et al.* und Castellaneta *et al.*, die weder eine verstärkte T-Zellproliferation noch eine höhere Anzahl an IFN- $\gamma^+$  T-Zellen bei der Untersuchung von humanen und murinen DCs detektieren konnten [282, 294]. Magelhaes *et al.* postulierten, dass die Aktivierung von NOD2 über MDP bei murinen BMDCs die Induktion einer  $T_H2$ -Antwort zur Folge hat [309]. Obwohl MDP-DCs signifikant mehr IL-6 sezernierten, welches u.a. eine  $T_H2$ -Antwort einleitet [350, 351], induzierten die MDP-DCs in der vorliegenden Arbeit keinen höheren Prozentsatz an IL-4 $^+$  T-Lymphozyten als iDCs. Dies lässt sich möglicherweise am ehesten durch die fehlende Produktion des  $T_H2$ -polarisierenden Zytokins IL-10 von Seiten der MDP-DCs und die Präsenz von IFN- $\gamma$  in der Kokultur erklären, welches die  $T_H2$ -Antwort inhibiert. Demzufolge scheint MDP, obwohl es sich hinsichtlich des Reifungszustands nicht von iDCs unterscheidet, über einen noch unbekannten Mechanismus im Rahmen der T-Zelldifferenzierung einen gewissen proinflammatorischen Einfluss zu haben.

Die Stimulation der DCs mit den Kombinationen aus LPS und Flagellin bzw. MDP führte im Vergleich zu LPS alleine, unabhängig vom DC-T-Zell-Verhältnis, zu keiner Veränderung der allopathen T-Zellproliferation oder T-Zelldifferenzierung. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen, dass die DCs, die mit den Kombinationen stimuliert wurden, keine verstärkte Ex-

pression der Reifungsmarker CD80, CD83 und CD86 sowie von HLA-DR und  $\beta_2$ M aufzeigten. Jedoch wurde die Sekretion von IL-12, IL-23 und IL-10 bei Kombination von LPS und MDP, im Vergleich zur alleinigen LPS-Stimulation signifikant verstärkt (siehe Kapitel 6.1.1 und 6.1.2). Interessanterweise beobachtete Tada *et al.*, dass die Stimulation von humanen DCs mit MDP und synthetischem Lipid A eine signifikant verstärkte *IFN- $\gamma$* -mRNA-Expression in allogenen T-Zellen induzierte, wobei der Effekt eindeutig von der Präsenz von IL-12 abhängig zu sein schien [283]. Obwohl die Kombination aus LPS und MDP in der vorliegenden Arbeit zwar zur signifikant verstärkten IL-12-Freisetzung führte, zeigte dies keinen Effekt hinsichtlich der Induktion der allogenen T-Zellproliferation und insbesondere keine Auswirkung auf die Generierung von *IFN- $\gamma$* <sup>+</sup> T-Zellen. Dies veranschaulicht, dass eine verstärkte T-Zellproliferation nicht ausschließlich von der vermehrten Zytokinsekretion abhängig ist, sondern noch durch andere, noch unbekannte Faktoren beeinflusst wird. Zudem lassen sich die Diskrepanzen der Ergebnissen von Tada *et al.* und denen der vorliegenden Arbeit möglicherweise durch den Einsatz einer wesentlich höheren Konzentration an MDP (10  $\mu$ g/ml) bei Tada *et al.* und die Verwendung von synthetisiertem Lipid A, welches den wirksamsten Teil von LPS darstellt [29, 30], erklären [282].

Wie von Jin *et al.* beschrieben wurde, exprimieren aktivierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen, ebenso wie auch DCs, auf ihrer Oberfläche die Rezeptoren TLR4 und TLR5 [352]. Die Stimulation von murinen CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit LPS aus *Salmonella typhimurium* induzierte deren Proliferation und *IFN- $\gamma$* -Sekretion, wie es von Liu *et al.* beobachtet werden konnte. Interessanterweise führte auch die Aktivierung von TLR4 bzw. TLR5 auf CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs über LPS bzw. Flagellin, in der Abwesenheit von APCs, direkt zur Aktivierung der Tregs und steigerte deren immunsuppressive Wirkung [353-355]. Da im menschlichen Körper die bakteriellen Stimuli nicht nacheinander oder gezielt auf die unterschiedlichen Zelltypen treffen, wäre es demzufolge interessant, in zukünftigen Versuchen zu evaluieren, ob sich Unterschiede hinsichtlich der T-Zellproliferation und -differenzierung im Vergleich zu den Ergebnissen dieser Arbeit ergeben, wenn man einer Kokultur aus unreifen DCs und naiven allogenen T-Zellen direkt die bakteriellen Stimuli zugeben bzw. die Reaktion von T-Zellen in Abwesenheit von APCs untersuchen würde. Rahman *et al.* zeigten nämlich, dass FoxP3<sup>+</sup> T-Zellen, die mit MDP stimuliert wurden, vor dem Fas-vermittelten Zelltod geschützt wurden, wobei dieser Effekt bei Vorhandensein eines NOD2-Polymorphismus nicht beobachtet werden konnte [356].

Da DCs in der Lage sind, 25(OH)-VD<sub>3</sub> zum aktiven Metaboliten 1,25(OH)<sub>2</sub>-VD<sub>3</sub> umzusetzen [152-154], wurden einem Teil der Ansätze in der vorliegenden Arbeit 25(OH)-VD<sub>3</sub> zugesetzt, um einen möglichen immunsupprimierenden Effekt von 1,25(OH)<sub>2</sub>-VD<sub>3</sub> auf die T-Zellproliferation feststellen zu können. Die Zugabe von 25(OH)-VD<sub>3</sub> bewirkte bei hohen LPS-DC-Konzentrationen nur einen schwachen inhibitorischen Effekt auf die Proliferation der allogenen T-Zellen, wobei bei niedrigeren DC-T-Zell-Verhältnissen von 625 bis 5000 DC/100.000 T-Zellen unter dem Einfluss von LPS eine verstärkte Suppression der T-Zellproliferationsrate zu detektieren war. Das unveränderte Ausmaß der T-Zellproliferation bei hohen DC-Konzentrationen lässt sich möglicherweise durch das Überwiegen des proinflammatorischen Einflusses von LPS erklären, der dem VD<sub>3</sub>-Effekt scheinbar überlegen ist.

Zudem scheint das „Vitamin-D-Binding“-Protein (DBP) eine regulierende Funktion hinsichtlich der Verfügbarkeit von 25(OH)-VD<sub>3</sub> für DCs zu haben, wie es von Jeffery *et al.* bei Versuchen mit humanen DCs beobachtet wurde. Da DBP das inaktive 25(OH)-VD<sub>3</sub> verstärkt bindet, entzieht es somit den DCs 25(OH)-VD<sub>3</sub> zur Metabolisierung in das aktive 1,25(OH)<sub>2</sub>-VD<sub>3</sub>, wodurch die antiinflammatorische Wirkung der DCs auf die T-Zellantwort inhibiert wird. Dies könnte auch im Falle der vorliegenden Dissertation zutreffen, da hierbei 5 %-iges AB-Serum, welches DBP enthalten müsste, dem Medium zugesetzt wurde, wobei Jeffery *et al.* den immunsupprimierenden Effekt auf die T-Zellproliferation in Serum-freien Medium beobachteten [336].

Obwohl Flag-DCs im Vergleich zu iDCs die mRNA von *CYP27B1* signifikant verstärkt exprimierten (siehe Kapitel 6.1.5), zeigte die Koinkubation von 25(OH)-VD<sub>3</sub> mit Flag-DCs keinerlei immunmodulatorische Auswirkungen auf die T-Zellproliferation, die allerdings auch ohne VD<sub>3</sub>-Einfluss durch die Stimulation mit Flagellin in ihrem Ausmaß nicht verändert wurde.

Auch die Kombination aus 25(OH)-VD<sub>3</sub> und MDP-DCs bewirkte keinerlei Veränderungen hinsichtlich der Proliferation der T-Zellen. Die Kombination von LPS und MDP inhibierte allerdings bei Anwesenheit von 25(OH)-VD<sub>3</sub> sowohl bei hohen als auch bei niedrigen DC-T-Zell-Verhältnissen die T-Zellproliferation. Die DCs, die mit der Kombination aus LPS und MDP stimuliert wurden, induzierten im Vergleich zu LPS alleine jedoch keine verstärkte mRNA-Expression von *CYP27B1*. Demzufolge müssen andere Mechanismen existieren, die den immunsuppressiven Effekt der Kombination von LPS und MDP auf die allogene T-Zellproliferation erklären könnten. Hierbei könnte möglicherweise MDP eine entscheidende Rolle zukommen (siehe Kapitel 6.2), da LPS in Kombination mit 25(OH)-VD<sub>3</sub> alleine keinen inhibitorischen Effekt auf die T-Zellproliferation bei hohen DC-Konzentrationen bewirkte. Zudem wäre es von besonderem Interesse zu evaluieren, welchen Effekt die mRNA-Expression der Vitamin-A-metabolisierenden Enzyme *ALDH1A1* und *ALDH1A2* hinsichtlich der T-Zellantwort haben könnte, da diese in den DCs bei der Stimulation mit der Kombination aus LPS und MDP, im Vergleich zu der mit LPS alleine, signifikant verstärkt exprimiert wurden (siehe Kapitel 6.1.5). Demzufolge wäre es für zukünftige Versuchsansätze interessant, durch Zugabe des Vorläufers Retinal zu den MLRs, den Einfluss von Vitamin A auf die T-Zellproliferation zu untersuchen, bzw. einen möglichen synergistischen Effekt der beiden Vitamine zu prüfen. Des Weiteren sollte im Rahmen der Messung von intrazellulären Zytokinen und des Transkriptionsfaktors FoxP3 evaluiert werden, welche Art von T-Zellen unter VD<sub>3</sub>- oder auch Vitamin A-Einfluss von den DCs induziert bzw. inhibiert werden.

Zudem wurde von Gambhir *et al.*, Chamorro *et al.* und Ferreira *et al.* beschrieben, dass 1,25(OH)<sub>2</sub>-VD<sub>3</sub>, welches von den DCs umgesetzt wurde, nur dann einen hemmenden Effekt auf die proinflammatorische LPS-Wirkung hinsichtlich der Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-6, TNF und IL-12 und der Induktion einer alloge- nen T-Zellproliferation hatte, wenn LPS zeitlich vor 1,25(OH)<sub>2</sub>-VD<sub>3</sub> direkt den murinen DCs zugegeben wurde [296, 357, 358]. Daher bietet es sich an, in zukünftigen Arbeiten die unreifen DCs zunächst mit 25(OH)-VD<sub>3</sub> zu inkubieren, ihnen im Verlauf die bakteriellen Stimuli zuzuführen und dann den Einfluss dieser DCs auf die allogene T-Zellproliferation und T-Zelldifferenzierung im Rahmen einer MLR zu untersuchen und mit den Ergebnissen dieser Arbeit zu



vergleichen. Tabelle 6.1 liefert eine Übersicht über die Einflüsse der unterschiedlichen bakteriellen Stimuli und deren Kombinationen auf humane DCs im Vergleich zu iDCs hinsichtlich der Oberflächenantigenexpression, der Zytokinsekretion, der Genexpression sowie der Auswirkungen auf die allogene T-Zellantwort in Abhängigkeit von VD<sub>3</sub>.

**Tabelle 6.1: Übersicht über die Einflüsse von LPS, Flagellin und MDP sowie deren Kombinationen auf humane DCs im Vergleich zu iDCs**

	LPS	Flagellin	MDP	LPS + Flagellin	LPS + MDP
<b>Oberflächenantigene</b>					
kostimulatorische Moleküle (CD80, CD86), Reifungsmarker (CD83, HLA-DR, $\beta_2$ M)	↑↑	– (↑ CD80)	–	↑↑	↑↑
koinhibitorische Moleküle (CD95, PD-L1)	↑↑	–	–	↑↑	↑↑
<b>Zytokinproduktion</b>					
proinflammatorische Zytokine (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF, IL-12, IL-23)	↑↑	– (↑ TNF, IL-6)	– (↑ IL-6)	↑↑	↑↑ (↑↑↑ IL-12, IL-23)
antiinflammatorisches Zytokin (IL-10)	↑↑	–	–	↑↑	↑↑↑
<b>Genexpression</b>					
PRRs ( <i>TLR4</i> , <i>TLR5</i> , <i>NALP3</i> )	↓↓	–	–	↓↓	↓↓
Autophagozytose ( <i>ATG16L1</i> )	–	–	–	–	–
Tryptophan-Stoffwechsel ( <i>IDO1</i> , <i>IDO2</i> , <i>AHR</i> )	↑↑	↑	–	↑↑	↑↑
Vitamin D <sub>3</sub> - Stoffwechsel ( <i>CYP27B1</i> )	↑↑	↑	–	↑↑	↑↑
Vitamin A- Stoffwechsel (nur <i>ALDH1A1</i> )	↓↓	↓	–	↑↑	↑↑ (+ <i>ALDH1A2</i> )
<b>Allogene T-Zellproliferation</b>					
ohne Vitamin D <sub>3</sub> -Einfluss	↑↑	–	–	↑↑	↑↑
unter Vitamin D <sub>3</sub> -Einfluss (v.a. bei niedrigen/mittleren DC-Konzentrationen)	↓	–	–	↓	↓
<b>Art der allopathen T-Zellen</b>					
T <sub>H</sub> 1-Zellen	↑↑	–	↑	↑↑	↑↑
T <sub>H</sub> 2-Zellen	–	–	–	–	–
FoxP3 <sup>+</sup> Tregs	↓↓	–	–	↓↓	↓↓

Abkürzungen: „↑“ = verstärkt exprimiert bzw. sezerniert; „↓“ = vermindert exprimiert bzw. sezerniert; „–“ = keine Veränderung;

## 6.2 Rolle von dendritischen Zellen in der Pathophysiologie der GvHD nach Inkubation mit bakteriellen Komponenten

Den Ergebnissen der vorliegenden Dissertation zufolge nimmt LPS, als proinflammatorischer Stimulus von DCs, eine zentrale Rolle ein. Dies spiegelte sich nicht zuletzt dadurch wieder, dass LPS-DCs in der vorliegenden Arbeit die Bildung von proinflammatorischen T<sub>H</sub>1-Zellen induzierten, wobei sie die Entstehung von FoxP3<sup>+</sup> Tregs inhibierten (siehe Kapitel 6.1.6). Dies steht im Einklang mit Angaben der Literatur, welche LPS eine essentielle Bedeutung in der Pathogenese der akuten GvHD zuschreiben. Die LPS-TNF-Achse wurde von Holler *et al.* als eine der Hauptpathomechanismen der GvHD beschrieben [258]. Cooke *et al.* veranschaulichten in ihrer Arbeit zudem, dass eine Antagonisierung von LPS durch B975, einem synthetischen Lipid-A-Analogen, zur Detektion verminderter Level an TNF, zu reduzierten intestinalen histopathologischen Gewebeschäden sowie zu verminderten Mortalitätsraten von Mäusen führte, wobei der „Graft-versus-Leukämie“ (GvL)-Effekt erhalten blieb [228].

Des Weiteren resultierten sowohl die Gabe von IL-1-Rezeptor-Antagonisten, sowie die Neutralisation von IL-1 und TNF in den Versuchen von Hill *et al.* und Dickinson *et al.* in einer verminderten GvHD-Mortalität und einer reduzierten Translokation von LPS in die Blutbahn [243, 257]. Zudem ist eine Assoziation von TLR4-Mutationen (rs4837656 und rs17582214) bei Patienten mit akuter GvHD von Sivula *et al.* beobachtet worden [359]. Außerdem zeigten Mäuse mit TLR4-Defizienz (TLR4 <sup>-/-</sup>) im GvHD-Modell von Zhao *et al.* einen deutlichen verminderten Gewebeschaden mit minimaler Lymphozyteninfiltration. Die DCs der TLR4-Knockout-Mäuse verblieben in unreifem Zustand, was sich an der reduzierten Expression der Reifungsmarker CD80, CD86 und CD40, sowie der MHC-II-Moleküle widerspiegelte. Da die DCs der TLR4-Knockout-Mäuse vermehrt IL-10 und parallel dazu weniger IL-12 sezernierten, wurde eine wesentlich geringere allogene T-Zellproliferation induziert [360]. Demzufolge ließ sich in der vorliegenden Arbeit der proinflammatorische Effekt von LPS auf DCs und auf die allogene T-Zellantwort bestätigen und unterstreicht die wesentliche Rolle von LPS in der Pathogenese der GvHD.

Flagellin hatte, wie es der Übersicht aus Tabelle 6.1 zu entnehmen ist, nur partiell proinflammatorische Auswirkungen auf die Eigenschaften von DCs und keinen wesentlichen Einfluss auf die allogene T-Zellantwort. Diese Ergebnisse widersprechen allerdings Arbeiten von einigen anderen Autoren, die TLR5 bzw. Flagellin eine immunprotektive Rolle im Immunsystem zuschreiben. TLR5-Knockout-Mäuse entwickelten in den Versuchen von Vijay-Kumar *et al.* durch die vermehrte Expression von proinflammatorischen Genen gehäuft spontane Kolitiden [262, 263]. Des Weiteren besteht eine Assoziation der TLR5-Mutation (rs10737416) mit der Entstehung der akuten GvHD [359]. Zudem zeigte sich ein protektiver Effekt von Flagellin auf Mäuse, die als Empfänger im allogenen SZT-Modell dienten, hinsichtlich des Auftretens der akuten GvHD und der damit assoziierten Gewebeschäden. Hierbei induzierte die Injektion von Flagellin die verstärkte Generierung von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> Tregs in den Empfängermäusen, wie es von den Arbeitsgruppen Hossain *et al.* und Gong *et al.* beobachtet werden konnte [264, 361]. Diese Beobachtungen *in vivo* stehen Ergebnissen von Manicassamy *et al.*, Agrawal *et al.* und Didierlaurent *et al.* entgegen, die *in vitro* eine proinflamma-

torische Antwort im Sinne einer induzierten  $T_H1$ - bzw.  $T_H2$ -Antwort als Reaktion auf Flagellin in ihren Arbeiten aufzeigten (siehe 6.1.6) [25, 348, 349]. Demzufolge scheint die genaue Rolle von Flagellin bzw. TLR5 im Immunsystem noch unklar zu sein.

Die Stimulation der DCs mit MDP zeigte im Rahmen der vorliegenden Dissertation einen nur geringen Einfluss auf die DC-Reifung, die Zytokinsekretion und das Ausmaß der alloge- nen T-Zellproliferation. Allerdings treten die bakteriellen Komponenten im menschlichen Körper normalerweise nicht isoliert voneinander auf die Immunzellen, sodass sich die bakteriellen Stimuli möglicherweise gegenseitig hinsichtlich ihrer Auswirkungen auf die Immunantwort regulieren. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich bei der Stimulation der DCs mit der Kombination von LPS und MDP einerseits eine signifikant verstärkte Sekretion der proinflammato- rischen Zytokine IL-12 und IL-23, andererseits aber auch eine vermehrte Freisetzung des antiinflammatorischen Zytokins IL-10. Interessanterweise induzierten hierbei MDP+LPS-DCs in der MLR bei niedrigen DC-Konzentrationen in Anwesenheit von 25(OH)-VD<sub>3</sub> eine signifi- kant geringere allogene T-Zellproliferation als LPS-DCs ohne VD<sub>3</sub>-Einfluss. In diesem Zu- sammenhang beobachtete Wang *et al.*, dass die *NOD2*-mRNA in humanen Monozyten nach Exposition zu 1,25-(OH)-VD<sub>3</sub> deutlich verstärkt exprimiert wurde [337]. Demzufolge hat mög- licherweise MDP in Kombination mit LPS erst dann einen supprimierenden Effekt auf die proinflammatorische LPS-Antwort im Rahmen der Induktion der alloge- nen T-Zell- proliferation, wenn eine Exposition der DCs zu Metaboliten des VD<sub>3</sub>-Stoffwechsels stattge- funden hat, dementsprechend *NOD2* hochreguliert wurde und somit MDP durch die erhöhte Rezeptordichte eine verstärkte immunsupprimierende Wirkung ausüben kann. Dies steht im Einklang mit den Meinungen anderer Autoren, die *NOD2* bzw. MDP eine immunhomöostati- sche Funktion zuschreiben [247, 249-253]. Möglicherweise führt eine Mutation von *NOD2* zur Dysregulation der Immunantwort, da die immunregulatorische Funktion von MDP entfällt und somit proinflammatorische Mechanismen, insbesondere die Induktion einer  $T_H1$ -Antwort bei gleichzeitiger Inhibition von Tregs unter LPS-Einfluss, überhand nehmen würden. Land- fried *et al.* machten hierbei die Beobachtung, dass *NOD2*-Mutationen mit einem signifikanten Verlust an CD4<sup>+</sup> T-Zellen, insbesondere FoxP3<sup>+</sup> Tregs, in Darm und Haut von Patienten nach allogener SZT assoziiert sind [248].

Zudem unterstreichen folgende Arbeiten die essentielle Rolle von VD<sub>3</sub> im Rahmen der allo- genen SZT bzw. GvHD. Wie von Joseph *et al.* gezeigt werden konnte, exprimierten humane alloreaktive Spender-T-Zellen, die als Vermittler der GvHD gelten, den VDR in deutlich ver- stärktem Ausmaß. Demzufolge führte die *in vitro* Vitamin D<sub>3</sub>-Gabe in deren Versuchen zu einer signifikant reduzierten alloreaktiven T-Zellantwort [362]. Daher scheinen die Effekte von Vitamin D<sub>3</sub> auf T-Zellen eine essentielle Bedeutung im Hinblick auf ein vermindertes Auftre- ten der GvHD nach allogener SZT zu haben. Dies spiegelt sich auch in den Beschreibungen von Kreutz *et al.*, Pakkala *et al.*, Rosenblatt *et al.* und Benrashid *et al.* wider, die einen Man- gel von VD<sub>3</sub> im Rahmen der akuten GvHD in ihren Untersuchungen beobachteten konnten [164, 271, 272, 363]. Des Weiteren konnte von Kreutz *et al.* gezeigt werden, dass eine pro- phylaktische UVB-Bestrahlung nach SZT das Ausmaß der Haut-GvHD deutlich vermindern konnte. Diese protektiven Auswirkungen konnten einer sinkenden Anzahl von Langerhans-

zellen und dermalen DCs des Empfängers, signifikant steigenden 25(OH)VD<sub>3</sub>-Leveln sowie einer erhöhten Anzahl an zirkulierenden CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> Tregs zugesprochen werden [275].

Des Weiteren induzierte die Stimulation der DCs mit LPS in Kombination sowohl mit Flagellin als auch LPS in der vorliegenden Arbeit eine signifikant verstärkte mRNA-Expression der Vitamin A-metabolisierenden Enzyme *ALDH1A1* und *ALDH1A2*. Koenecke *et al.* beschrieben hierbei eine essentielle Rolle von Vitamin A hinsichtlich der Pathogenese der Darm-GvHD in Mäusen. In Vitamin A-defizienten (VAD) Mäusen, die einer allogenen SZT unterzogen wurden, ließen sich einerseits eine verminderte Anzahl an Spender-CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Darm, andererseits vermehrte Zellzahlen und Gewebeschäden in anderen GvHD-Organen der VAD-Mäuse nachweisen. Dies wurde auf ein gestörtes Darm-„Homing“ durch den Vitamin A-Mangel zurückgeführt, wobei eine verminderte Expression der „Homing“-Rezeptoren  $\alpha_4\beta_7$ -Integrin und CCR9 im GALT (*gut associated lymphoid tissue*) der VAD-Mäuse zu beobachten war. Die VAD-Mäuse überlebten zwar länger, allerdings wurden sie nicht vor dem Auftreten der GvHD geschützt. Zudem ließen sich vermehrt CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Spender-T-Zellen und eine geringere Anzahl an CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> Spender-T-Zellen in VAD-Mäusen detektieren. Demzufolge reduzierte ein Vitamin-A-Mangel das Auftreten einer Darm-GvHD, bewirkte aber dennoch eine fatale Entzündungsreaktion in anderen GvHD-Organen nach allogener SZT [364].

Aus den dargelegten Daten lässt sich daher festhalten, dass möglicherweise gerade die Kombination aus Vitamin A und Vitamin D<sub>3</sub> synergistische Wirkungen hinsichtlich der Prävention der GvHD nach allogener SZT haben könnte. Zudem könnte eine NOD2-Mutation bei DCs, die simultan mit LPS und MDP stimuliert wurden, eventuell eine verminderte mRNA-Expression von *ALDH1A1* und *ALDH1A2* sowie eine fehlende Inhibition der allogenen T-Zellproliferation unter Vitamin D<sub>3</sub>-Einfluss bewirken, wodurch die immunprotektiven Wirkungen von Vitamin A und Vitamin D<sub>3</sub> bei NOD2-Mangel inhibiert bzw. aufgehoben werden könnten und eine überschießende proinflammatorische Immunantwort die Folge wäre.

Grundlage dieser Arbeit war die Annahme, dass konventionelle hämatopoetische DCs durch die Interaktion mit allogenen T-Lymphozyten eine Hauptrolle im Rahmen der Induktion der akuten GvHD spielen. Aus diesem Grund lag es nahe, diese Zellen und ihren Einfluss auf allogene T-Zellen genau zu charakterisieren. Allerdings werden zirkulierende DCs im Rahmen des Chimärismus rasch durch Spender-DCs ersetzt [365], die wiederum in der Lage sind, durch das Anbieten von Empfänger-Antigenen gegenüber Spender-T-Zellen die GvHD zu verstärken [366]. Des Weiteren können nach Angaben von Koyama *et al.* nicht nur konventionelle DCs, sondern auch pDCs allogene T-Zellen primen und eine GvHD auslösen [367]. Wie von Kim *et al.* beschrieben wurde, können auch organabstammende DCs, die unter anderem „Homing“-Moleküle auf alloreaktiven T-Lymphozyten induzieren, zu einer Verschlimmerung der GvHD, besonders im Darm, führen [368]. Neue Studien stellen DCs an sich als Hauptinduktoren der GvHD in Frage. So ließ sich bei Untersuchungen von Koyama *et al.* veranschaulichen, dass murine nicht-hämatopoetische Empfänger-APCs in den GvHD-Zielorganen eine universelle Spender-T-Zellexpansion induzierten, welche mit einer erhöhten GvHD-Mortalität in Assoziation stand [369]. Des Weiteren konnte von Li *et al.* gezeigt werden, dass auch der Verlust von konventionellen DCs des Empfängers, sowie von pDCs als

auch von B-Zellen keinen ausreichenden Schutz vor einer Entstehung der GvHD darstellt [370]. Zuletzt konnten alloreaktive T-Zellen trotz gestörtem TLR-Signalwegen, über die DCs unter anderem ihre Wirkung ausüben, und verminderten IL-12 und IL-1 $\beta$ -Konzentrationen aktiviert werden [371]. Allerdings muss hierbei erwähnt werden, dass sich diese Daten nur auf Ergebnisse aus Tiermodellen beziehen und erst evaluiert werden müsste, ob diese Beobachtungen auch für Menschen zutreffend sind. Demnach wäre es interessant, auf Grundlage der Ergebnisse der vorliegenden Dissertation, auch andere humane Zellen, wie zum Beispiel Immunzellen aus GvHD-Organen oder andere zelluläre Bestandteile des Blutes bezüglich der Pathophysiologie der GvHD zu untersuchen und im Hinblick auf NOD2-Mutationen, auch Zellen von Spendern mit NOD2-Mangel bzw. Dysfunktion zu analysieren. Zudem exprimieren, wie auch schon in Kapitel 6.1.6 erwähnt, auch T-Zellen selbst TLRs und werden von einzelnen bakteriellen Stimuli beeinflusst [352, 356], sodass des Weiteren evaluiert werden sollte, inwiefern die bakteriellen Komponenten Einfluss auf isolierte T-Zellen haben könnten.

## 7 Zusammenfassung

Die Translokation von bakteriellen Komponenten wie beispielsweise Lipopolysaccharid (LPS) durch eine geschädigte Epithelbarriere, die im Rahmen der myeloablativen Konditionierung vor der Stammzelltransplantation (SZT) entsteht, spielt eine wesentliche Rolle in der Pathogenese der akuten „Graft-versus-Host-Disease“ (GvHD). Hierbei wird dendritischen Zellen (DC, *dendritic cell*) des Empfängers als Antigen-präsentierende Zellen eine essentielle Bedeutung in der Detektion dieser bakteriellen Komponenten zugeschrieben, was die Induktion der für die akute GvHD typischen Entzündungsreaktion zur Folge hat. Des Weiteren bestehen Assoziationen von Mutationen der Rezeptoren NOD2 (*nucleotide-binding oligomerisation domain-containing protein*), „Toll-like“-Rezeptor (TLR) 4 und TLR5 sowie des Vitamin-D-Rezeptors (VDR) mit dem Auftreten der akuten GvHD und einer damit verbundenen erhöhten Mortalität. DCs sind zudem durch die Expression von Vitamin D<sub>3</sub> (VD<sub>3</sub>)- und Vitamin A-metabolisierenden Enzymen, wie die 25-Hydroxycholesterol-1 $\alpha$ -Hydroxylase (CYP27B1) und die Aldehyddehydrogenasen ALDH1A1-3, in der Lage, die aktiven Metabolite 1,25-Dihydroxy-Vitamin D<sub>3</sub> (1,25(OH)<sub>2</sub>-VD<sub>3</sub>) und Retinsäure aus deren Vorstufen zu synthetisieren. DCs verfügen somit über immunregulatorische Mechanismen, die der Aufrechterhaltung der Immunhomöostase dienen. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, inwiefern die Bestandteile sowohl grampositiver als auch gramnegativer Bakterien wie LPS, Flagellin und Muramyl-dipeptid (MDP) und deren Kombinationen, die Eigenschaften von DCs verändern bzw. beeinflussen.

LPS zeigte den stärksten proinflammatorischen Einfluss auf die humanen DCs. Es induzierte über die verstärkte Expression von kostimulatorischen Molekülen wie CD86 sowie der HLA-Moleküle HLA-DR und  $\beta_2$ M ( $\beta_2$ -Mikroglobulin) die Reifung der DCs. Des Weiteren sezernierten die DCs, die mit LPS stimuliert wurden (LPS-DC), signifikant erhöhte Mengen an proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 $\beta$ , TNF (Tumornekrosefaktor), IL-6, IL-8, IL-23 und IL-12. Dies spiegelte sich in der verstärkten Induktion einer allogenen T-Zellproliferation wider, bei der vor allem T<sub>H</sub>1-typische IFN (Interferon)  $\gamma^+$  T-Zellen und deutlich weniger T<sub>H</sub>2-typische IL-4<sup>+</sup> T-Zellen und FoxP3<sup>+</sup> (*forkhead-box protein 3*) T-Zellen detektiert wurden. Neben den proinflammatorischen Einflüssen von LPS ließen sich im Sinne der Aufrechterhaltung der Immunhomöostase zudem immunregulatorische Veränderungen, wie eine verstärkte Sekretion von IL-10, eine erhöhte Expression des koinhibitorischen Moleküls PD-L1 (*programmed cell death ligand*), des Fas-Rezeptors CD95 sowie der Indolamin-2,3-dihydrogenasen (IDO) 1, IDO2 und des Arylhydrocarbonrezeptors (AHR) in LPS-DCs beobachten. LPS inhibierte die mRNA-Expression von *ALDH1A1* in den DCs, wohingegen es die von *CYP27B1* signifikant verstärkte. Die Zugabe von 25-Hydroxy-Vitamin D<sub>3</sub> (25(OH)-VD<sub>3</sub>), dem Vorläufer von 1,25(OH)<sub>2</sub>-VD<sub>3</sub>, führte bei niedrigen DC-T-Zellkonzentrationen zu einer verminderten T-Zellproliferation, womit LPS einen Einfluss auf den VD<sub>3</sub>-Stoffwechsel von DC hat.

Die Inkubation der DCs mit Flagellin (Flag-DC) zeigte einen nur begrenzt stimulatorischen Einfluss auf die Zellen. Flagellin induzierte nur partiell eine verstärkte Expression der DC-

Reifungsmarker wie CD80 sowie eine vermehrte Freisetzung von TNF, IL-6 und IL-8. Dies steht in Kongruenz mit den Beobachtungen, dass Flag-DCs weder die allogene T-Zellproliferation noch die T-Zelldifferenzierung beeinflussten. Zudem wurde die mRNA-Expression von *TLR5* und *ALDH1A1* nach Einfluss von Flagellin in den DCs signifikant herabreguliert, wobei die mRNA von *CYP27B1* und *IDO1*, *IDO2* und *AHR* nach Flagellin-Einfluss in den DCs signifikant verstärkt exprimiert wurde. Die Zugabe von 25(OH)-VD<sub>3</sub> zu den Flag-DCs hatte keinen inhibitorischen Einfluss auf die allogene T-Zellproliferation.

Demgegenüber bewirkte MDP im Vergleich zur Kontrolle zwar keine Veränderungen bezüglich des Reifungszustandes der DCs, induzierte allerdings die verstärkte Sekretion von IL-6, wobei die Freisetzung der übrigen Zytokine und die mRNA-Expression aller untersuchten Gene durch MDP unbeeinflusst blieben. Die Stimulation der DCs mit MDP (MDP-DC) im Vergleich zu iDCs hatte, auch bei Anwesenheit von 25(OH)-VD<sub>3</sub>, keine Auswirkungen auf das Ausmaß der allogenen T-Zellproliferation. Allerdings ließ sich bei der Inkubation der allogenen T-Zellen mit MDP-DCs ein signifikant höherer Anteil an IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> T-Zellen nachweisen. Die Stimulation der DCs mit der Kombination von LPS und MDP zeigte zwar im Vergleich zur Stimulation mit LPS alleine keinen Einfluss auf den Reifungszustand der DCs im Hinblick auf die Oberflächenantigenexpression und die Auswirkungen auf die allogene T-Zellantwort, induzierte allerdings eine signifikant verstärkte Sekretion der T-Zellpolarisierenden Zytokine IL-12, IL-23 und IL-10. Interessanterweise exprimierten die DCs, die mit LPS und MDP bzw. Flagellin stimuliert wurden (MDP+LPS-DC bzw. Flag+LPS-DC), im Vergleich zu LPS alleine die mRNA von *ALDH1A1* und *ALDH1A2* in signifikant verstärktem Maße. Zudem führte die Zugabe des Vitamin D<sub>3</sub>-Vorläufers zur einer verminderten allogenen Proliferation der T-Zellen bei Inkubation mit MDP+LPS-DCs, was darauf hindeutet, dass MDP einen immunregulatorischen Einfluss auf die LPS-vermittelte proinflammatorische Immunantwort haben könnte. Dieser Einfluss könnte allerdings beim Vorliegen von NOD2-Polymorphismen gestört werden, was eine Dysregulation der Immunantwort und eine überschießende Entzündungsantwort zur Folge hätte, wie es auch bei der akuten GvHD zu beobachten ist. Demnach sollte die genaue Rolle und der Zusammenhang der beiden Vitamine mit NOD2-Polymorphismen im Hinblick auf deren Einflüsse auf humane DCs und die allogene T-Zellantwort in zukünftigen Arbeiten evaluiert werden.

## 8 Literaturverzeichnis

- [1] Abbas A. H., Lichtman A.H. and Pillai S. 2009. Cellular and Molecular Immunology. *Saunders Verlag*, 6th updated edition.
- [2] Murphy, K. 2012. Janeway`s immunobiology. *Garland Science*, 8th edition.
- [3] Rassow J., Hauser K., Netzkner R. and Deutzmann R. 2008. Biochemie. *Duale Reihe, Thieme Verlag Stuttgart*, 2. Auflage.
- [4] Medzhitov, R. and Janeway, C., Jr. 2000. Innate immunity. *N Engl J Med*, 343, 338-344.
- [5] Banchereau, J. and Steinman, R. M. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392, 245-252.
- [6] Randolph, G. J., Angeli, V. and Swartz, M. A. 2005. Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. *Nat Rev Immunol*, 5, 617-628.
- [7] Niess, J. H., Brand, S., Gu, X., Landsman, L., Jung, S., McCormick, B. A., Vyas, J. M., Boes, M., Ploegh, H. L., Fox, J. G., Littman, D. R. and Reinecker, H. C. 2005. CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science*, 307, 254-258.
- [8] Visintin, A., Mazzoni, A., Spitzer, J. H., Wyllie, D. H., Dower, S. K. and Segal, D. M. 2001. Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells. *J Immunol*, 166, 249-255.
- [9] Hartmann, G., Weiner, G. J. and Krieg, A. M. 1999. CpG DNA: a potent signal for growth, activation, and maturation of human dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 9305-9310.
- [10] Means, T. K., Hayashi, F., Smith, K. D., Aderem, A. and Luster, A. D. 2003. The Toll-like receptor 5 stimulus bacterial flagellin induces maturation and chemokine production in human dendritic cells. *J Immunol*, 170, 5165-5175.
- [11] Janeway, C. A., Jr. and Medzhitov, R. 2002. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*, 20, 197-216.
- [12] Lutz, M. B. and Schuler, G. 2002. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol*, 23, 445-449.



- [13] Burgdorf, S. and Kurts, C. 2008. Endocytosis mechanisms and the cell biology of antigen presentation. *Curr Opin Immunol*, 20, 89-95.
- [14] Jonuleit, H., Kuhn, U., Muller, G., Steinbrink, K., Paragnik, L., Schmitt, E., Knop, J. and Enk, A. H. 1997. Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur J Immunol*, 27, 3135-3142.
- [15] Cella, M., Scheidegger, D., Palmer-Lehmann, K., Lane, P., Lanzavecchia, A. and Alber, G. 1996. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J Exp Med*, 184, 747-752.
- [16] Randolph, G. J. 2001. Dendritic cell migration to lymph nodes: cytokines, chemokines, and lipid mediators. *Semin Immunol*, 13, 267-274.
- [17] Fritz, J. H., Girardin, S. E., Fitting, C., Werts, C., Mengin-Lecreulx, D., Caroff, M., Cavaillon, J. M., Philpott, D. J. and Adib-Conquy, M. 2005. Synergistic stimulation of human monocytes and dendritic cells by Toll-like receptor 4 and NOD1- and NOD2-activating agonists. *Eur J Immunol*, 35, 2459-2470.
- [18] Kapsenberg, M. L. 2003. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol*, 3, 984-993.
- [19] Mazzoni, A. and Segal, D. M. 2004. Controlling the Toll road to dendritic cell polarization. *J Leukoc Biol*, 75, 721-730.
- [20] Groux, H., Fournier, N. and Cottrez, F. 2004. Role of dendritic cells in the generation of regulatory T cells. *Semin Immunol*, 16, 99-106.
- [21] Steinbrink, K., Wolf, M., Jonuleit, H., Knop, J. and Enk, A. H. 1997. Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J Immunol*, 159, 4772-4780.
- [22] Sato, K., Yamashita, N., Baba, M. and Matsuyama, T. 2003. Regulatory dendritic cells protect mice from murine acute graft-versus-host disease and leukemia relapse. *Immunity*, 18, 367-379.
- [23] Steinman, R. M., Hawiger, D. and Nussenzweig, M. C. 2003. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol*, 21, 685-711.
- [24] Sallusto, F. and Lanzavecchia, A. 1994. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating

factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med*, 179, 1109-1118.

[25] Manicassamy, S. and Pulendran, B. 2009. Modulation of adaptive immunity with Toll-like receptors. *Semin Immunol*, 21, 185-193.

[26] Akira, S., Uematsu, S. and Takeuchi, O. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124, 783-801.

[27] Blander, J. M. and Medzhitov, R. 2004. Regulation of phagosome maturation by signals from toll-like receptors. *Science*, 304, 1014-1018.

[28] Blander, J. M. 2007. Coupling Toll-like receptor signaling with phagocytosis: potentiation of antigen presentation. *Trends Immunol*, 28, 19-25.

[29] Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M. Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B. and Beutler, B. 1998. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*, 282, 2085-2088.

[30] Qureshi, S. T., Lariviere, L., Leveque, G., Clermont, S., Moore, K. J., Gros, P. and Malo, D. 1999. Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4). *J Exp Med*, 189, 615-625.

[31] Schumann, R. R., Leong, S. R., Flagg, G. W., Gray, P. W., Wright, S. D., Mathison, J. C., Tobias, P. S. and Ulevitch, R. J. 1990. Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science*, 249, 1429-1431.

[32] Ulevitch, R. J. and Tobias, P. S. 1995. Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annu Rev Immunol*, 13, 437-457.

[33] Hayashi, F., Smith, K. D., Ozinsky, A., Hawn, T. R., Yi, E. C., Goodlett, D. R., Eng, J. K., Akira, S., Underhill, D. M. and Aderem, A. 2001. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*, 410, 1099-1103.

[34] Dowling, D., Hamilton, C. M. and O'Neill, S. M. 2008. A comparative analysis of cytokine responses, cell surface marker expression and MAPKs in DCs matured with LPS compared with a panel of TLR ligands. *Cytokine*, 41, 254-262.

[35] Dearman, R. J., Cumberbatch, M., Maxwell, G., Basketter, D. A. and Kimber, I. 2009. Toll-like receptor ligand activation of murine bone marrow-derived dendritic cells. *Immunology*, 126, 475-484.

- [36] Mosser, D. M. and Zhang, X. 2008. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunol Rev*, 226, 205-218.
- [37] Institute for Inflammation Research, R. U. H., Copenhagen. 2009. Toll-like receptor (TLR) signaling. [www.inflammation.dk/iir/09inn/\\_tlrsig.htm](http://www.inflammation.dk/iir/09inn/_tlrsig.htm).
- [38] Inohara, N., Ogura, Y., Fontalba, A., Gutierrez, O., Pons, F., Crespo, J., Fukase, K., Inamura, S., Kusumoto, S., Hashimoto, M., Foster, S. J., Moran, A. P., Fernandez-Luna, J. L. and Nunez, G. 2003. Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *J Biol Chem*, 278, 5509-5512.
- [39] Ogura, Y., Inohara, N., Benito, A., Chen, F. F., Yamaoka, S. and Nunez, G. 2001. Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *J Biol Chem*, 276, 4812-4818.
- [40] Kobayashi, K., Inohara, N., Hernandez, L. D., Galan, J. E., Nunez, G., Janeway, C. A., Medzhitov, R. and Flavell, R. A. 2002. RICK/Rip2/CARDIAK mediates signalling for receptors of the innate and adaptive immune systems. *Nature*, 416, 194-199.
- [41] Martinon, F. and Tschopp, J. 2005. NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens. *Trends Immunol*, 26, 447-454.
- [42] Girardin, S. E., Boneca, I. G., Viala, J., Chamaillard, M., Labigne, A., Thomas, G., Philpott, D. J. and Sansonetti, P. J. 2003. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem*, 278, 8869-8872.
- [43] Martinon, F., Agostini, L., Meylan, E. and Tschopp, J. 2004. Identification of bacterial muramyl dipeptide as activator of the NALP3/cryopyrin inflammasome. *Curr Biol*, 14, 1929-1934.
- [44] Martinon, F. and Tschopp, J. 2007. Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation. *Cell Death Differ*, 14, 10-22.
- [45] Gutierrez, O., Pipaon, C., Inohara, N., Fontalba, A., Ogura, Y., Prosper, F., Nunez, G. and Fernandez-Luna, J. L. 2002. Induction of Nod2 in myelomonocytic and intestinal epithelial cells via nuclear factor-kappa B activation. *J Biol Chem*, 277, 41701-41705.
- [46] Strober, W., Murray, P. J., Kitani, A. and Watanabe, T. 2006. Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nat Rev Immunol*, 6, 9-20.

- [47] Cooney, R., Baker, J., Brain, O., Danis, B., Pichulik, T., Allan, P., Ferguson, D. J., Campbell, B. J., Jewell, D. and Simmons, A. 2010. NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation. *Nat Med*, 16, 90-97.
- [48] Brain, O., Allan, P. and Simmons, A. 2010. NOD2-mediated autophagy and Crohn disease. *Autophagy*, 6, 412-414.
- [49] Levine, B. and Kroemer, G. 2008. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*, 132, 27-42.
- [50] Naser, S. A., Arce, M., Khaja, A., Fernandez, M., Naser, N., Elwasila, S. and Thanigachalam, S. 2012. Role of ATG16L, NOD2 and IL23R in Crohn's disease pathogenesis. *World J Gastroenterol*, 18, 412-424.
- [51] Dengjel, J., Schoor, O., Fischer, R., Reich, M., Kraus, M., Muller, M., Kreymborg, K., Altenberend, F., Brandenburg, J., Kalbacher, H., Brock, R., Driessen, C., Rammensee, H. G. and Stevanovic, S. 2005. Autophagy promotes MHC class II presentation of peptides from intracellular source proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 7922-7927.
- [52] Schmid, D., Pypaert, M. and Munz, C. 2007. Antigen-loading compartments for major histocompatibility complex class II molecules continuously receive input from autophagosomes. *Immunity*, 26, 79-92.
- [53] Mahlke K., Murphy K.M., Travers P., Walport M., Seidler L. and Haußer-Siller I. 2009. Janeway Immunologie. *Spektrum Akademischer Verlag*, 7. Auflage.
- [54] Tsushima, F., Yao, S., Shin, T., Flies, A., Flies, S., Xu, H., Tamada, K., Pardoll, D. M. and Chen, L. 2007. Interaction between B7-H1 and PD-1 determines initiation and reversal of T-cell anergy. *Blood*, 110, 180-185.
- [55] Tokita, D., Mazariegos, G. V., Zahorchak, A. F., Chien, N., Abe, M., Raimondi, G. and Thomson, A. W. 2008. High PD-L1/CD86 ratio on plasmacytoid dendritic cells correlates with elevated T-regulatory cells in liver transplant tolerance. *Transplantation*, 85, 369-377.
- [56] Perrot, I., Blanchard, D., Freymond, N., Isaac, S., Guibert, B., Pacheco, Y. and Lebecque, S. 2007. Dendritic cells infiltrating human non-small cell lung cancer are blocked at immature stage. *J Immunol*, 178, 2763-2769.
- [57] Greenwald, R. J., Freeman, G. J. and Sharpe, A. H. 2005. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol*, 23, 515-548.

- [58] Rodriguez-Garcia, M., Porichis, F., de Jong, O. G., Levi, K., Diefenbach, T. J., Lifson, J. D., Freeman, G. J., Walker, B. D., Kaufmann, D. E. and Kavanagh, D. G. 2011. Expression of PD-L1 and PD-L2 on human macrophages is up-regulated by HIV-1 and differentially modulated by IL-10. *J Leukoc Biol*, 89, 507-515.
- [59] Koppi, T. A., Tough-Bement, T., Lewinsohn, D. M., Lynch, D. H. and Alderson, M. R. 1997. CD40 ligand inhibits Fas/CD95-mediated apoptosis of human blood-derived dendritic cells. *Eur J Immunol*, 27, 3161-3165.
- [60] Leverkus, M., Walczak, H., McLellan, A., Fries, H. W., Terbeck, G., Brocker, E. B. and Kampgen, E. 2000. Maturation of dendritic cells leads to up-regulation of cellular FLICE-inhibitory protein and concomitant down-regulation of death ligand-mediated apoptosis. *Blood*, 96, 2628-2631.
- [61] Willems, F., Amraoui, Z., Vanderheyde, N., Verhasselt, V., Aksoy, E., Scaffidi, C., Peter, M. E., Krammer, P. H. and Goldman, M. 2000. Expression of c-FLIP(L) and resistance to CD95-mediated apoptosis of monocyte-derived dendritic cells: inhibition by bisindolylmaleimide. *Blood*, 95, 3478-3482.
- [62] Rathmell, J. C., Cooke, M. P., Ho, W. Y., Grein, J., Townsend, S. E., Davis, M. M. and Goodnow, C. C. 1995. CD95 (Fas)-dependent elimination of self-reactive B cells upon interaction with CD4+ T cells. *Nature*, 376, 181-184.
- [63] Fukuyama, H., Adachi, M., Suematsu, S., Miwa, K., Suda, T., Yoshida, N. and Nagata, S. 2002. Requirement of Fas expression in B cells for tolerance induction. *Eur J Immunol*, 32, 223-230.
- [64] Mabrouk, I., Buart, S., Hasmim, M., Michiels, C., Connault, E., Opolon, P., Chiocchia, G., Levi-Strauss, M., Chouaib, S. and Karray, S. 2008. Prevention of autoimmunity and control of recall response to exogenous antigen by Fas death receptor ligand expression on T cells. *Immunity*, 29, 922-933.
- [65] Stranges, P. B., Watson, J., Cooper, C. J., Choisy-Rossi, C. M., Stonebraker, A. C., Beighton, R. A., Hartig, H., Sundberg, J. P., Servick, S., Kaufmann, G., Fink, P. J. and Chervonsky, A. V. 2007. Elimination of antigen-presenting cells and autoreactive T cells by Fas contributes to prevention of autoimmunity. *Immunity*, 26, 629-641.
- [66] Hof H. and Dörris R. 2009. Medizinische Mikrobiologie. *Duale Reihe, Thieme Verlag Stuttgart*, 4. Auflage.
- [67] Weaver, C. T., Harrington, L. E., Mangan, P. R., Gavrieli, M. and Murphy, K. M. 2006. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity*, 24, 677-688.

- [68] Jetten, A. M. 2009. Retinoid-related orphan receptors (RORs): critical roles in development, immunity, circadian rhythm, and cellular metabolism. *Nucl Recept Signal*, 7, e003.
- [69] Iwasaki, A. and Kelsall, B. L. 1999. Freshly isolated Peyer's patch, but not spleen, dendritic cells produce interleukin 10 and induce the differentiation of T helper type 2 cells. *J Exp Med*, 190, 229-239.
- [70] Stumbles, P. A., Thomas, J. A., Pimm, C. L., Lee, P. T., Venaille, T. J., Proksch, S. and Holt, P. G. 1998. Resting respiratory tract dendritic cells preferentially stimulate T helper cell type 2 (Th2) responses and require obligatory cytokine signals for induction of Th1 immunity. *J Exp Med*, 188, 2019-2031.
- [71] Moore, K. W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L. and O'Garra, A. 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*, 19, 683-765.
- [72] Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T. B., Oukka, M., Weiner, H. L. and Kuchroo, V. K. 2006. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*, 441, 235-238.
- [73] van Beelen, A. J., Zelinkova, Z., Taanman-Kueter, E. W., Muller, F. J., Hommes, D. W., Zaat, S. A., Kapsenberg, M. L. and de Jong, E. C. 2007. Stimulation of the intracellular bacterial sensor NOD2 programs dendritic cells to promote interleukin-17 production in human memory T cells. *Immunity*, 27, 660-669.
- [74] Lyakh, L., Trinchieri, G., Provezza, L., Carra, G. and Gerosa, F. 2008. Regulation of interleukin-12/interleukin-23 production and the T-helper 17 response in humans. *Immunol Rev*, 226, 112-131.
- [75] Pasare, C. and Medzhitov, R. 2003. Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science*, 299, 1033-1036.
- [76] Ivanov, I., McKenzie, B. S., Zhou, L., Tadokoro, C. E., Lepelley, A., Lafaille, J. J., Cua, D. J. and Littman, D. R. 2006. The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$  directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell*, 126, 1121-1133.
- [77] Peterson, R. A. 2012. Regulatory T-cells: diverse phenotypes integral to immune homeostasis and suppression. *Toxicol Pathol*, 40, 186-204.
- [78] Mills, K. H. 2004. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? *Nat Rev Immunol*, 4, 841-855.

- [79] Sakaguchi, S. 2000. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell*, 101, 455-458.
- [80] Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M. and Toda, M. 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*, 155, 1151-1164.
- [81] Fontenot, J. D., Gavin, M. A. and Rudensky, A. Y. 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol*, 4, 330-336.
- [82] Hori, S., Nomura, T. and Sakaguchi, S. 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*, 299, 1057-1061.
- [83] Malek, T. R. and Bayer, A. L. 2004. Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2. *Nat Rev Immunol*, 4, 665-674.
- [84] D'Cruz, L. M. and Klein, L. 2005. Development and function of agonist-induced CD25+Foxp3+ regulatory T cells in the absence of interleukin 2 signaling. *Nat Immunol*, 6, 1152-1159.
- [85] Thornton, A. M., Donovan, E. E., Piccirillo, C. A. and Shevach, E. M. 2004. Cutting edge: IL-2 is critically required for the in vitro activation of CD4+CD25+ T cell suppressor function. *J Immunol*, 172, 6519-6523.
- [86] Fontenot, J. D., Rasmussen, J. P., Gavin, M. A. and Rudensky, A. Y. 2005. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol*, 6, 1142-1151.
- [87] Levings, M. K., Bacchetta, R., Schulz, U. and Roncarolo, M. G. 2002. The role of IL-10 and TGF-beta in the differentiation and effector function of T regulatory cells. *Int Arch Allergy Immunol*, 129, 263-276.
- [88] Suci-Foca, N., Manavalan, J. S., Scotto, L., Kim-Schulze, S., Galluzzo, S., Naiyer, A. J., Fan, J., Vlad, G. and Cortesini, R. 2005. Molecular characterization of allospecific T suppressor and tolerogenic dendritic cells: review. *Int Immunopharmacol*, 5, 7-11.
- [89] Moffett, J. R. and Namboodiri, M. A. 2003. Tryptophan and the immune response. *Immunol Cell Biol*, 81, 247-265.
- [90] Munn, D. H., Shafizadeh, E., Attwood, J. T., Bondarev, I., Pashine, A. and Mellor, A. L. 1999. Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *J Exp Med*, 189, 1363-1372.

- [91] Mellor, A. L. and Munn, D. H. 1999. Tryptophan catabolism and T-cell tolerance: immunosuppression by starvation? *Immunol Today*, 20, 469-473.
- [92] Higuchi K., Kuno S. and Hayaishi O. 1963. Enzymatic formation of D-kynurenine. *Federation Proc.*, 22, 243.
- [93] Ball, H. J., Sanchez-Perez, A., Weiser, S., Austin, C. J., Astelbauer, F., Miu, J., McQuillan, J. A., Stocker, R., Jermini, L. S. and Hunt, N. H. 2007. Characterization of an indoleamine 2,3-dioxygenase-like protein found in humans and mice. *Gene*, 396, 203-213.
- [94] Munn, D. H., Sharma, M. D., Lee, J. R., Jhaver, K. G., Johnson, T. S., Keskin, D. B., Marshall, B., Chandler, P., Antonia, S. J., Burgess, R., Slingluff, C. L., Jr. and Mellor, A. L. 2002. Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. *Science*, 297, 1867-1870.
- [95] Mellor, A. L. and Munn, D. H. 2004. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol*, 4, 762-774.
- [96] Fallarino, F., Asselin-Paturel, C., Vacca, C., Bianchi, R., Gizzi, S., Fioretti, M. C., Trinchieri, G., Grohmann, U. and Puccetti, P. 2004. Murine plasmacytoid dendritic cells initiate the immunosuppressive pathway of tryptophan catabolism in response to CD200 receptor engagement. *J Immunol*, 173, 3748-3754.
- [97] Mellor, A. L., Baban, B., Chandler, P. R., Manlapat, A., Kahler, D. J. and Munn, D. H. 2005. Cutting edge: CpG oligonucleotides induce splenic CD19<sup>+</sup> dendritic cells to acquire potent indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent T cell regulatory functions via IFN Type 1 signaling. *J Immunol*, 175, 5601-5605.
- [98] Hill, M., Tanguy-Royer, S., Royer, P., Chauveau, C., Asghar, K., Tesson, L., Lavainne, F., Remy, S., Brion, R., Hubert, F. X., Heslan, M., Rimbert, M., Berthelot, L., Moffett, J. R., Josien, R., Gregoire, M. and Anegon, I. 2007. IDO expands human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatory T cells by promoting maturation of LPS-treated dendritic cells. *Eur J Immunol*, 37, 3054-3062.
- [99] Munn, D. H., Zhou, M., Attwood, J. T., Bondarev, I., Conway, S. J., Marshall, B., Brown, C. and Mellor, A. L. 1998. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science*, 281, 1191-1193.
- [100] Kim, D. K., Kanai, Y., Chairoungdua, A., Matsuo, H., Cha, S. H. and Endou, H. 2001. Expression cloning of a Na<sup>+</sup>-independent aromatic amino acid transporter with structural similarity to H<sup>+</sup>/monocarboxylate transporters. *J Biol Chem*, 276, 17221-17228.



- [101] Kudo, Y. and Boyd, C. A. 2001. Characterisation of L-tryptophan transporters in human placenta: a comparison of brush border and basal membrane vesicles. *J Physiol*, 531, 405-416.
- [102] Zegarra-Moran, O., Folli, C., Manzari, B., Ravazzolo, R., Varesio, L. and Galletta, L. J. 2004. Double mechanism for apical tryptophan depletion in polarized human bronchial epithelium. *J Immunol*, 173, 542-549.
- [103] Edinger, A. L. and Thompson, C. B. 2002. Antigen-presenting cells control T cell proliferation by regulating amino acid availability. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 1107-1109.
- [104] Mellor, A. L., Baban, B., Chandler, P., Marshall, B., Jhaver, K., Hansen, A., Koni, P. A., Iwashima, M. and Munn, D. H. 2003. Cutting edge: induced indoleamine 2,3 dioxygenase expression in dendritic cell subsets suppresses T cell clonal expansion. *J Immunol*, 171, 1652-1655.
- [105] Denison, M. S. and Nagy, S. R. 2003. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 43, 309-334.
- [106] DiNatale, B. C., Murray, I. A., Schroeder, J. C., Flaveny, C. A., Lahoti, T. S., Laurenzana, E. M., Omiecinski, C. J. and Perdew, G. H. 2010. Kynurenine acid is a potent endogenous aryl hydrocarbon receptor ligand that synergistically induces interleukin-6 in the presence of inflammatory signaling. *Toxicol Sci*, 115, 89-97.
- [107] Veldhoen, M., Hirota, K., Christensen, J., O'Garra, A. and Stockinger, B. 2009. Natural agonists for aryl hydrocarbon receptor in culture medium are essential for optimal differentiation of Th17 T cells. *J Exp Med*, 206, 43-49.
- [108] Gandhi, R., Kumar, D., Burns, E. J., Nadeau, M., Dake, B., Laroni, A., Kozoriz, D., Weiner, H. L. and Quintana, F. J. 2010. Activation of the aryl hydrocarbon receptor induces human type 1 regulatory T cell-like and Foxp3(+) regulatory T cells. *Nat Immunol*, 11, 846-853.
- [109] Mezrich, J. D., Fechner, J. H., Zhang, X., Johnson, B. P., Burlingham, W. J. and Bradfield, C. A. 2010. An interaction between kynurenine and the aryl hydrocarbon receptor can generate regulatory T cells. *J Immunol*, 185, 3190-3198.
- [110] Nguyen, N. T., Kimura, A., Nakahama, T., Chinen, I., Masuda, K., Nohara, K., Fujii-Kuriyama, Y. and Kishimoto, T. 2010. Aryl hydrocarbon receptor negatively regulates dendritic cell immunogenicity via a kynurenine-dependent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 19961-19966.

- [111] Vogel, C. F., Goth, S. R., Dong, B., Pessah, I. N. and Matsumura, F. 2008. Aryl hydrocarbon receptor signaling mediates expression of indoleamine 2,3-dioxygenase. *Biochem Biophys Res Commun*, 375, 331-335.
- [112] Jux, B., Kadow, S. and Esser, C. 2009. Langerhans cell maturation and contact hypersensitivity are impaired in aryl hydrocarbon receptor-null mice. *J Immunol*, 182, 6709-6717.
- [113] Rutella, S., Danese, S. and Leone, G. 2006. Tolerogenic dendritic cells: cytokine modulation comes of age. *Blood*, 108, 1435-1440.
- [114] Fallarino, F., Grohmann, U., You, S., McGrath, B. C., Cavener, D. R., Vacca, C., Orabona, C., Bianchi, R., Belladonna, M. L., Volpi, C., Santamaria, P., Fioretti, M. C. and Puccetti, P. 2006. The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells. *J Immunol*, 176, 6752-6761.
- [115] Muller, A. J., DuHadaway, J. B., Donover, P. S., Sutanto-Ward, E. and Prendergast, G. C. 2005. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase, an immunoregulatory target of the cancer suppression gene Bin1, potentiates cancer chemotherapy. *Nat Med*, 11, 312-319.
- [116] Ueno, A., Cho, S., Cheng, L., Wang, J., Hou, S., Nakano, H., Santamaria, P. and Yang, Y. 2007. Transient upregulation of indoleamine 2,3-dioxygenase in dendritic cells by human chorionic gonadotropin downregulates autoimmune diabetes. *Diabetes*, 56, 1686-1693.
- [117] Kastner, P., Mark, M. and Chambon, P. 1995. Nonsteroid nuclear receptors: what are genetic studies telling us about their role in real life? *Cell*, 83, 859-869.
- [118] Napoli, J. L. 1999. Interactions of retinoid binding proteins and enzymes in retinoid metabolism. *Biochim Biophys Acta*, 1440, 139-162.
- [119] Duester, G. 2000. Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function: production of visual pigment and retinoic acid. *Eur J Biochem*, 267, 4315-4324.
- [120] Iwata, M. 2009. Retinoic acid production by intestinal dendritic cells and its role in T-cell trafficking. *Semin Immunol*, 21, 8-13.
- [121] de Lera, A. R., Bourguet, W., Altucci, L. and Gronemeyer, H. 2007. Design of selective nuclear receptor modulators: RAR and RXR as a case study. *Nat Rev Drug Discov*, 6, 811-820.

- [122] Iwata, M., Hirakiyama, A., Eshima, Y., Kagechika, H., Kato, C. and Song, S. Y. 2004. Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells. *Immunity*, 21, 527-538.
- [123] Coombes, J. L., Siddiqui, K. R., Arancibia-Carcamo, C. V., Hall, J., Sun, C. M., Belkaid, Y. and Powrie, F. 2007. A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med*, 204, 1757-1764.
- [124] Lampen, A., Meyer, S., Arnhold, T. and Nau, H. 2000. Metabolism of vitamin A and its active metabolite all-trans-retinoic acid in small intestinal enterocytes. *J Pharmacol Exp Ther*, 295, 979-985.
- [125] Villablanca, E. J., Wang, S., de Calisto, J., Gomes, D. C., Kane, M. A., Napoli, J. L., Blaner, W. S., Kagechika, H., Blomhoff, R., Roseblatt, M., Bono, M. R., von Andrian, U. H. and Mora, J. R. 2011. MyD88 and retinoic acid signaling pathways interact to modulate gastrointestinal activities of dendritic cells. *Gastroenterology*, 141, 176-185.
- [126] Collins, C. B., Aherne, C. M., Kominsky, D., McNamee, E. N., Lebsack, M. D., Eltzschig, H., Jedlicka, P. and Rivera-Nieves, J. 2011. Retinoic acid attenuates ileitis by restoring the balance between T-helper 17 and T regulatory cells. *Gastroenterology*, 141, 1821-1831.
- [127] Mucida, D., Park, Y., Kim, G., Turovskaya, O., Scott, I., Kronenberg, M. and Cheroutre, H. 2007. Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science*, 317, 256-260.
- [128] Benson, M. J., Pino-Lagos, K., Roseblatt, M. and Noelle, R. J. 2007. All-trans retinoic acid mediates enhanced T reg cell growth, differentiation, and gut homing in the face of high levels of co-stimulation. *J Exp Med*, 204, 1765-1774.
- [129] Butcher, E. C., Williams, M., Youngman, K., Rott, L. and Briskin, M. 1999. Lymphocyte trafficking and regional immunity. *Adv Immunol*, 72, 209-253.
- [130] Masopust, D., Vezys, V., Marzo, A. L. and Lefrancois, L. 2001. Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue. *Science*, 291, 2413-2417.
- [131] Kantele, A., Zivny, J., Hakkinen, M., Elson, C. O. and Mestecky, J. 1999. Differential homing commitments of antigen-specific T cells after oral or parenteral immunization in humans. *J Immunol*, 162, 5173-5177.

- [132] Campbell, D. J. and Butcher, E. C. 2002. Rapid acquisition of tissue-specific homing phenotypes by CD4(+) T cells activated in cutaneous or mucosal lymphoid tissues. *J Exp Med*, 195, 135-141.
- [133] Svensson, M., Marsal, J., Ericsson, A., Carramolino, L., Broden, T., Marquez, G. and Agace, W. W. 2002. CCL25 mediates the localization of recently activated CD8alphabeta(+) lymphocytes to the small-intestinal mucosa. *J Clin Invest*, 110, 1113-1121.
- [134] Johansson-Lindbom, B., Svensson, M., Wurbel, M. A., Malissen, B., Marquez, G. and Agace, W. 2003. Selective generation of gut tropic T cells in gut-associated lymphoid tissue (GALT): requirement for GALT dendritic cells and adjuvant. *J Exp Med*, 198, 963-969.
- [135] Hamann, A., Andrew, D. P., Jablonski-Westrich, D., Holzmann, B. and Butcher, E. C. 1994. Role of alpha 4-integrins in lymphocyte homing to mucosal tissues in vivo. *J Immunol*, 152, 3282-3293.
- [136] Mora, J. R., Bono, M. R., Manjunath, N., Weninger, W., Cavanagh, L. L., Roseblatt, M. and Von Andrian, U. H. 2003. Selective imprinting of gut-homing T cells by Peyer's patch dendritic cells. *Nature*, 424, 88-93.
- [137] Stagg, A. J., Kamm, M. A. and Knight, S. C. 2002. Intestinal dendritic cells increase T cell expression of alpha4beta7 integrin. *Eur J Immunol*, 32, 1445-1454.
- [138] Hoag, K. A., Nashold, F. E., Gorman, J. and Hayes, C. E. 2002. Retinoic acid enhances the T helper 2 cell development that is essential for robust antibody responses through its action on antigen-presenting cells. *J Nutr*, 132, 3736-3739.
- [139] Iwata, M., Eshima, Y. and Kagechika, H. 2003. Retinoic acids exert direct effects on T cells to suppress Th1 development and enhance Th2 development via retinoic acid receptors. *Int Immunol*, 15, 1017-1025.
- [140] Stephensen, C. B., Rasooly, R., Jiang, X., Cedia, M. A., Weaver, C. T., Chandraratna, R. A. and Bucy, R. P. 2002. Vitamin A enhances in vitro Th2 development via retinoid X receptor pathway. *J Immunol*, 168, 4495-4503.
- [141] Dawson, H. D., Collins, G., Pyle, R., Key, M., Weeraratna, A., Deep-Dixit, V., Nadal, C. N. and Taub, D. D. 2006. Direct and indirect effects of retinoic acid on human Th2 cytokine and chemokine expression by human T lymphocytes. *BMC Immunol*, 7, 27.
- [142] Mora, J. R., Iwata, M., Eksteen, B., Song, S. Y., Junt, T., Senman, B., Otipoby, K. L., Yokota, A., Takeuchi, H., Ricciardi-Castagnoli, P., Rajewsky, K., Adams, D. H. and von

- Andrian, U. H. 2006. Generation of gut-homing IgA-secreting B cells by intestinal dendritic cells. *Science*, 314, 1157-1160.
- [143] Coombes, J. L. and Powrie, F. 2008. Dendritic cells in intestinal immune regulation. *Nat Rev Immunol*, 8, 435-446.
- [144] Holick, M. F. 2007. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med*, 357, 3, 266-281.
- [145] Haddad, J. G., Matsuoka, L. Y., Hollis, B. W., Hu, Y. Z. and Wortsman, J. 1993. Human plasma transport of vitamin D after its endogenous synthesis. *J Clin Invest*, 91, 2552-2555.
- [146] Takeyama, K., Kitanaka, S., Sato, T., Kobori, M., Yanagisawa, J. and Kato, S. 1997. 25-Hydroxyvitamin D3 1alpha-hydroxylase and vitamin D synthesis. *Science*, 277, 1827-1830.
- [147] Schmitz G. 2013. Normwerte für 25-Hydroxy-Vitamin D3 im menschlichen Körper. *Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, Universität Regensburg*.
- [148] Fu, G. K., Lin, D., Zhang, M. Y., Bikle, D. D., Shackleton, C. H., Miller, W. L. and Portale, A. A. 1997. Cloning of human 25-hydroxyvitamin D-1 alpha-hydroxylase and mutations causing vitamin D-dependent rickets type 1. *Mol Endocrinol*, 11, 1961-1970.
- [149] Zehnder, D., Bland, R., Williams, M. C., McNinch, R. W., Howie, A. J., Stewart, P. M. and Hewison, M. 2001. Extrarenal expression of 25-hydroxyvitamin d(3)-1 alpha-hydroxylase. *J Clin Endocrinol Metab*, 86, 888-894.
- [150] Zehnder, D., Bland, R., Chana, R. S., Wheeler, D. C., Howie, A. J., Williams, M. C., Stewart, P. M. and Hewison, M. 2002. Synthesis of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) by human endothelial cells is regulated by inflammatory cytokines: a novel autocrine determinant of vascular cell adhesion. *J Am Soc Nephrol*, 13, 621-629.
- [151] Kreutz, M., Andreesen, R., Krause, S. W., Szabo, A., Ritz, E. and Reichel, H. 1993. 1,25-dihydroxyvitamin D3 production and vitamin D3 receptor expression are developmentally regulated during differentiation of human monocytes into macrophages. *Blood*, 82, 1300-1307.
- [152] Gottfried, E., Rehli, M., Hahn, J., Holler, E., Andreesen, R. and Kreutz, M. 2006. Monocyte-derived cells express CYP27A1 and convert vitamin D3 into its active metabolite. *Biochem Biophys Res Commun*, 349, 209-213.

- [153] Fritsche, J., Mondal, K., Ehrnsperger, A., Andreesen, R. and Kreutz, M. 2003. Regulation of 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub>-1  $\alpha$ -hydroxylase and production of 1  $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> by human dendritic cells. *Blood*, 102, 3314-3316.
- [154] Hewison, M., Freeman, L., Hughes, S. V., Evans, K. N., Bland, R., Eliopoulos, A. G., Kilby, M. D., Moss, P. A. and Chakraverty, R. 2003. Differential regulation of vitamin D receptor and its ligand in human monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol*, 170, 5382-5390.
- [155] Deluca, H. F. 1977. Vitamin D metabolism. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 7 Suppl, 1s-17s.
- [156] DeLuca, H. F. 2004. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *Am J Clin Nutr*, 80, 1689S-1696S.
- [157] Schrader, M., Bendik, I., Becker-Andre, M. and Carlberg, C. 1993. Interaction between retinoic acid and vitamin D signaling pathways. *J Biol Chem*, 268, 17830-17836.
- [158] Penna, G. and Adorini, L. 2000. 1  $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation. *J Immunol*, 164, 2405-2411.
- [159] Piemonti, L., Monti, P., Sironi, M., Fraticelli, P., Leone, B. E., Dal Cin, E., Allavena, P. and Di Carlo, V. 2000. Vitamin D<sub>3</sub> affects differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol*, 164, 4443-4451.
- [160] Adams, J. S., Ren, S., Liu, P. T., Chun, R. F., Lagishetty, V., Gombart, A. F., Borregaard, N., Modlin, R. L. and Hewison, M. 2009. Vitamin d-directed rheostatic regulation of monocyte antibacterial responses. *J Immunol*, 182, 4289-4295.
- [161] Enioutina, E. Y., Bareyan, D. and Daynes, R. A. 2009. TLR-induced local metabolism of vitamin D<sub>3</sub> plays an important role in the diversification of adaptive immune responses. *J Immunol*, 182, 4296-4305.
- [162] Penna, G., Roncari, A., Amuchastegui, S., Daniel, K. C., Berti, E., Colonna, M. and Adorini, L. 2005. Expression of the inhibitory receptor ILT3 on dendritic cells is dispensable for induction of CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Blood*, 106, 3490-3497.
- [163] Ghoreishi, M., Bach, P., Obst, J., Komba, M., Fleet, J. C. and Dutz, J. P. 2009. Expansion of antigen-specific regulatory T cells with the topical vitamin d analog calcipotriol. *J Immunol*, 182, 6071-6078.

- [164] Rosenblatt, J., Bissonnette, A., Ahmad, R., Wu, Z., Vasir, B., Stevenson, K., Zarwan, C., Keefe, W., Glotzbecker, B., Mills, H., Joyce, R., Levine, J. D., Tzachanis, D., Boussiotis, V., Kufe, D. and Avigan, D. 2010. Immunomodulatory effects of vitamin D: implications for GVHD. *Bone Marrow Transplant*, 45, 1463-1468.
- [165] Mora, J. R., Iwata, M. and von Andrian, U. H. 2008. Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage. *Nat Rev Immunol*, 8, 685-698.
- [166] Kreutz, M. and Andreessen, R. 1990. Induction of human monocyte to macrophage maturation in vitro by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Blood*, 76, 2457-2461.
- [167] D'Ambrosio, D., Cippitelli, M., Cocciolo, M. G., Mazzeo, D., Di Lucia, P., Lang, R., Sinigaglia, F. and Panina-Bordignon, P. 1998. Inhibition of IL-12 production by 1,25-dihydroxyvitamin D3. Involvement of NF-kappaB downregulation in transcriptional repression of the p40 gene. *J Clin Invest*, 101, 252-262.
- [168] Lemire, J. M. 1995. Immunomodulatory actions of 1,25-dihydroxyvitamin D3. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 53, 599-602.
- [169] Penna, G., Amuchastegui, S., Cossetti, C., Aquilano, F., Mariani, R., Sanvito, F., Doglioni, C. and Adorini, L. 2006. Treatment of experimental autoimmune prostatitis in nonobese diabetic mice by the vitamin D receptor agonist elocalcitol. *J Immunol*, 177, 8504-8511.
- [170] Daniel, C., Sartory, N. A., Zahn, N., Radeke, H. H. and Stein, J. M. 2008. Immune modulatory treatment of trinitrobenzene sulfonic acid colitis with calcitriol is associated with a change of a T helper (Th) 1/Th17 to a Th2 and regulatory T cell profile. *J Pharmacol Exp Ther*, 324, 23-33.
- [171] Adorini, L. 2005. Intervention in autoimmunity: the potential of vitamin D receptor agonists. *Cell Immunol*, 233, 115-124.
- [172] Boonstra, A., Barrat, F. J., Crain, C., Heath, V. L., Savelkoul, H. F. and O'Garra, A. 2001. 1alpha,25-Dihydroxyvitamin d3 has a direct effect on naive CD4(+) T cells to enhance the development of Th2 cells. *J Immunol*, 167, 4974-4980.
- [173] Hart, P. H., Gorman, S. and Finlay-Jones, J. J. 2011. Modulation of the immune system by UV radiation: more than just the effects of vitamin D? *Nat Rev Immunol*, 11, 584-596.
- [174] Mora, J. R., Cheng, G., Picarella, D., Briskin, M., Buchanan, N. and von Andrian, U. H. 2005. Reciprocal and dynamic control of CD8 T cell homing by dendritic cells from skin- and gut-associated lymphoid tissues. *J Exp Med*, 201, 303-316.

- [175] Tietz, W., Allemand, Y., Borges, E., von Laer, D., Hallmann, R., Vestweber, D. and Hamann, A. 1998. CD4+ T cells migrate into inflamed skin only if they express ligands for E- and P-selectin. *J Immunol*, 161, 963-970.
- [176] Reiss, Y., Proudfoot, A. E., Power, C. A., Campbell, J. J. and Butcher, E. C. 2001. CC chemokine receptor (CCR)4 and the CCR10 ligand cutaneous T cell-attracting chemokine (CTACK) in lymphocyte trafficking to inflamed skin. *J Exp Med*, 194, 1541-1547
- [177] Sigmundsdottir, H., Pan, J., Debes, G. F., Alt, C., Habtezion, A., Soler, D. and Butcher, E. C. 2007. DCs metabolize sunlight-induced vitamin D3 to 'program' T cell attraction to the epidermal chemokine CCL27. *Nat Immunol*, 8, 285-293.
- [178] Bastie, J. N., Balitrand, N., Guidez, F., Guillemot, I., Larghero, J., Calabresse, C., Chomienne, C. and Delva, L. 2004. 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 transrepresses retinoic acid transcriptional activity via vitamin D receptor in myeloid cells. *Mol Endocrinol*, 18, 2685-2699.
- [179] Yamanaka, K., Dimitroff, C. J., Fuhlbrigge, R. C., Kakeda, M., Kurokawa, I., Mizutani, H. and Kupper, T. S. 2008. Vitamins A and D are potent inhibitors of cutaneous lymphocyte-associated antigen expression. *J Allergy Clin Immunol*, 121, 148-157 e143.
- [180] Weisdorf, D., Haake, R., Blazar, B., Miller, W., McGlave, P., Ramsay, N., Kersey, J. and Filipovich, A. 1990. Treatment of moderate/severe acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation: an analysis of clinical risk features and outcome. *Blood*, 75, 1024-1030.
- [181] Gooley, T. A., Chien, J. W., Pergam, S. A., Hingorani, S., Sorrow, M. L., Boeckh, M., Martin, P. J., Sandmaier, B. M., Marr, K. A., Appelbaum, F. R., Storb, R. and McDonald, G. B. 2010. Reduced mortality after allogeneic hematopoietic-cell transplantation. *N Engl J Med*, 363, 2091-2101.
- [182] Link, H., Kolb, H. J., Ebell, W., Hossfeld, D. K., Zander, A., Niethammer, D., Wandt, H., Grosse-Wilde, H. and Schaefer, U. W. 1997. [Transplantation of hematopoietic stem cells. II: Indications for transplantation of hematopoietic stem cells after myeloablative therapy]. *Med Klin (Munich)*, 92, 534-545.
- [183] Vermynen, C. 2003. Hematopoietic stem cell transplantation in sickle cell disease. *Blood Rev*, 17, 163-166.
- [184] Thomas, E. D. 1975. Bone marrow transplantation: prospects for leukemia and other conditions. *Proc Inst Med Chic*, 30, 256-258.



- [185] Weiden, P. L., Flournoy, N., Thomas, E. D., Prentice, R., Fefer, A., Buckner, C. D. and Storb, R. 1979. Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic-marrow grafts. *N Engl J Med*, 300, 1068-1073.
- [186] Buckner, C. D., Clift, R. A., Fefer, A., Lerner, K. G., Neiman, P. E., Storb, R. and Thomas, E. D. 1974. Marrow transplantation for the treatment of acute leukemia using HL-A-identical siblings. *Transplant Proc*, 6, 365-366.
- [187] Storb R., Yu C. and Mc Sweeney P. 1998. Mixed chimerism after transplantation of allogeneic hematopoietic cells. In: *Thomas ED, Blume KG, Forman SJ. Hematopoietic Cell Transplantation. 2nd ed. Blackwell Science, Malden, MA, 287-295.*
- [188] Krensky, A. M., Weiss, A., Crabtree, G., Davis, M. M. and Parham, P. 1990. T-lymphocyte-antigen interactions in transplant rejection. *N Engl J Med*, 322, 510-517.
- [189] Petersdorf, E. W. and Malkki, M. 2006. Genetics of risk factors for graft-versus-host disease. *Semin Hematol*, 43, 11-23.
- [190] Ratanatharathorn, V., Nash, R. A., Przepiorka, D., Devine, S. M., Klein, J. L., Weisdorf, D., Fay, J. W., Nademanee, A., Antin, J. H., Christiansen, N. P., van der Jagt, R., Herzig, R. H., Litzow, M. R., Wolff, S. N., Longo, W. L., Petersen, F. B., Karanes, C., Avalos, B., Storb, R., Buell, D. N., Maher, R. M., Fitzsimmons, W. E. and Wingard, J. R. 1998. Phase III study comparing methotrexate and tacrolimus (prograf, FK506) with methotrexate and cyclosporine for graft-versus-host disease prophylaxis after HLA-identical sibling bone marrow transplantation. *Blood*, 92, 2303-2314.
- [191] Loiseau, P., Busson, M., Balere, M. L., Dormoy, A., Bignon, J. D., Gagne, K., Gebuhrer, L., Dubois, V., Jollet, I., Bois, M., Perrier, P., Masson, D., Moine, A., Absi, L., Reviron, D., Lepage, V., Tamouza, R., Toubert, A., Marry, E., Chir, Z., Jouet, J. P., Blaise, D., Charron, D. and Raffoux, C. 2007. HLA Association with hematopoietic stem cell transplantation outcome: the number of mismatches at HLA-A, -B, -C, -DRB1, or -DQB1 is strongly associated with overall survival. *Biol Blood Marrow Transplant*, 13, 965-974.
- [192] Stelljes, M., Hermann, S., Albring, J., Kohler, G., Loffler, M., Franzius, C., Poremba, C., Schlosser, V., Volkmann, S., Opitz, C., Bremer, C., Kucharzik, T., Silling, G., Schober, O., Berdel, W. E., Schafers, M. and Kienast, J. 2008. Clinical molecular imaging in intestinal graft-versus-host disease: mapping of disease activity, prediction, and monitoring of treatment efficiency by positron emission tomography. *Blood*, 111, 2909-2918.
- [193] Falkenburg, J. H., Marijt, W. A., Heemskerk, M. H. and Willemze, R. 2002. Minor histocompatibility antigens as targets of graft-versus-leukemia reactions. *Curr Opin Hematol*, 9, 497-502.

- [194] Simpson, E., Scott, D., James, E., Lombardi, G., Cwynarski, K., Dazzi, F., Millrain, M. and Dyson, P. J. 2002. Minor H antigens: genes and peptides. *Transpl Immunol*, 10, 115-123.
- [195] Kollman, C., Howe, C. W., Anasetti, C., Antin, J. H., Davies, S. M., Filipovich, A. H., Hegland, J., Kamani, N., Kernan, N. A., King, R., Ratanatharathorn, V., Weisdorf, D. and Confer, D. L. 2001. Donor characteristics as risk factors in recipients after transplantation of bone marrow from unrelated donors: the effect of donor age. *Blood*, 98, 2043-2051.
- [196] Arasteh K., Baenkler H.-W. and Bieber C. 2009. Innere Medizin. *Duale Reihe. Thieme Verlag Stuttgart*, 2. Auflage.
- [197] Apperley J., Carreras E., Gluckman E., Gratwohl A. and Masszi T. 2008. Haematopoietic Stem Cell Transplantation. *The EBMT Handbook*, 5th Edition, 219-234.
- [198] Korngold, R. and Sprent, J. 1978. Lethal graft-versus-host disease after bone marrow transplantation across minor histocompatibility barriers in mice. Prevention by removing mature T cells from marrow. *J Exp Med*, 148, 1687-1698.
- [199] Reddy, P., Maeda, Y., Liu, C., Krijanovski, O. I., Korngold, R. and Ferrara, J. L. 2005. A crucial role for antigen-presenting cells and alloantigen expression in graft-versus-leukemia responses. *Nat Med*, 11, 1244-1249.
- [200] Shlomchik, W. D. 2007. Graft-versus-host disease. *Nat Rev Immunol*, 7, 340-352.
- [201] Ferrara, J. L. and Deeg, H. J. 1991. Graft-versus-host disease. *N Engl J Med*, 324, 667-674.
- [202] Vogelsang, G. B., Lee, L. and Bensen-Kennedy, D. M. 2003. Pathogenesis and treatment of graft-versus-host disease after bone marrow transplant. *Annu Rev Med*, 54, 29-52.
- [203] Hildebrandt, G. C., Olkiewicz, K. M., Corrion, L. A., Chang, Y., Clouthier, S. G., Liu, C. and Cooke, K. R. 2004. Donor-derived TNF-alpha regulates pulmonary chemokine expression and the development of idiopathic pneumonia syndrome after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*, 104, 586-593.
- [204] Ferrara, J. L., Levine, J. E., Reddy, P. and Holler, E. 2009. Graft-versus-host disease. *Lancet*, 373, 1550-1561.

- [205] Snover, D. C., Weisdorf, S. A., Ramsay, N. K., McGlave, P. and Kersey, J. H. 1984. Hepatic graft versus host disease: a study of the predictive value of liver biopsy in diagnosis. *Hepatology*, 4, 123-130.
- [206] Fujii, N., Takenaka, K., Shinagawa, K., Ikeda, K., Maeda, Y., Sunami, K., Hiramatsu, Y., Matsuo, K., Ishimaru, F., Niiya, K., Yoshino, T., Hirabayashi, N. and Harada, M. 2001. Hepatic graft-versus-host disease presenting as an acute hepatitis after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 27, 1007-1010.
- [207] Holler, E., Rogler, G., Herfarth, H., Brenmoehl, J., Wild, P. J., Hahn, J., Eissner, G., Scholmerich, J. and Andreesen, R. 2004. Both donor and recipient NOD2/CARD15 mutations associate with transplant-related mortality and GvHD following allogeneic stem cell transplantation. *Blood*, 104, 889-894.
- [208] Ferrara, J. L. 2000. Pathogenesis of acute graft-versus-host disease: cytokines and cellular effectors. *J Hematother Stem Cell Res*, 9, 299-306.
- [209] Hill, G. R. and Ferrara, J. L. 2000. The primacy of the gastrointestinal tract as a target organ of acute graft-versus-host disease: rationale for the use of cytokine shields in allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*, 95, 2754-2759.
- [210] Reddy, P. and Ferrara, J. L. 2003. Immunobiology of acute graft-versus-host disease. *Blood Rev*, 17, 187-194.
- [211] Ferrara, J. L. 1993. Cytokine dysregulation as a mechanism of graft versus host disease. *Curr Opin Immunol*, 5, 794-799.
- [212] Xun, C. Q., Thompson, J. S., Jennings, C. D., Brown, S. A. and Widmer, M. B. 1994. Effect of total body irradiation, busulfan-cyclophosphamide, or cyclophosphamide conditioning on inflammatory cytokine release and development of acute and chronic graft-versus-host disease in H-2-incompatible transplanted SCID mice. *Blood*, 83, 2360-2367.
- [213] Holler, E., Ertl, B., Hintermeier-Knabe, R., Roncarolo, M. G., Eissner, G., Mayer, F., Fraunberger, P., Behrends, U., Pfannes, W., Kolb, H. J. and Wilmanns, W. 1997. Inflammatory reactions induced by pretransplant conditioning--an alternative target for modulation of acute GvHD and complications following allogeneic bone marrow transplantation? *Leuk Lymphoma*, 25, 217-224.
- [214] Teshima, T. and Ferrara, J. L. 2002. Understanding the alloresponse: new approaches to graft-versus-host disease prevention. *Semin Hematol*, 39, 15-22.

- [215] Pober, J. S., Orosz, C. G., Rose, M. L. and Savage, C. O. 1996. Can graft endothelial cells initiate a host anti-graft immune response? *Transplantation*, 61, 343-349.
- [216] Ohl, L., Mohaupt, M., Czeloth, N., Hintzen, G., Kiafard, Z., Zwirner, J., Blankenstein, T., Henning, G. and Forster, R. 2004. CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions. *Immunity*, 21, 279-288.
- [217] Johansson-Lindbom, B., Svensson, M., Pabst, O., Palmqvist, C., Marquez, G., Forster, R. and Agace, W. W. 2005. Functional specialization of gut CD103+ dendritic cells in the regulation of tissue-selective T cell homing. *J Exp Med*, 202, 1063-1073.
- [218] Wysocki, C. A., Panoskaltsis-Mortari, A., Blazar, B. R. and Serody, J. S. 2005. Leukocyte migration and graft-versus-host disease. *Blood*, 105, 4191-4199.
- [219] Duffner, U., Lu, B., Hildebrandt, G. C., Teshima, T., Williams, D. L., Reddy, P., Ordemann, R., Clouthier, S. G., Lowler, K., Liu, C., Gerard, C., Cooke, K. R. and Ferrara, J. L. 2003. Role of CXCR3-induced donor T-cell migration in acute GVHD. *Exp Hematol*, 31, 897-902.
- [220] Hildebrandt, G. C., Corrion, L. A., Olkiewicz, K. M., Lu, B., Lowler, K., Duffner, U. A., Moore, B. B., Kuziel, W. A., Liu, C. and Cooke, K. R. 2004. Blockade of CXCR3 receptor:ligand interactions reduces leukocyte recruitment to the lung and the severity of experimental idiopathic pneumonia syndrome. *J Immunol*, 173, 2050-2059.
- [221] Wysocki, C. A., Burkett, S. B., Panoskaltsis-Mortari, A., Kirby, S. L., Luster, A. D., McKinnon, K., Blazar, B. R. and Serody, J. S. 2004. Differential roles for CCR5 expression on donor T cells during graft-versus-host disease based on pretransplant conditioning. *J Immunol*, 173, 845-854.
- [222] Varona, R., Cadenas, V., Gomez, L., Martinez, A. C. and Marquez, G. 2005. CCR6 regulates CD4+ T-cell-mediated acute graft-versus-host disease responses. *Blood*, 106, 18-26.
- [223] Terwey, T. H., Kim, T. D., Kochman, A. A., Hubbard, V. M., Lu, S., Zakrzewski, J. L., Ramirez-Montagut, T., Eng, J. M., Muriglan, S. J., Heller, G., Murphy, G. F., Liu, C., Budak-Alpdogan, T., Alpdogan, O. and van den Brink, M. R. 2005. CCR2 is required for CD8-induced graft-versus-host disease. *Blood*, 106, 3322-3330.
- [224] Jaksch, M., Remberger, M. and Mattsson, J. 2005. Increased gene expression of chemokine receptors is correlated with acute graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, 11, 280-287.

- [225] Chakraverty, R., Cote, D., Buchli, J., Cotter, P., Hsu, R., Zhao, G., Sachs, T., Pitsillides, C. M., Bronson, R., Means, T., Lin, C. and Sykes, M. 2006. An inflammatory checkpoint regulates recruitment of graft-versus-host reactive T cells to peripheral tissues. *J Exp Med*, 203, 2021-2031.
- [226] Zhang, Y., Shlomchik, W. D., Joe, G., Louboutin, J. P., Zhu, J., Rivera, A., Giannola, D. and Emerson, S. G. 2002. APCs in the liver and spleen recruit activated allogeneic CD8+ T cells to elicit hepatic graft-versus-host disease. *J Immunol*, 169, 7111-7118.
- [227] Mapara, M. Y., Leng, C., Kim, Y. M., Bronson, R., Lokshin, A., Luster, A. and Sykes, M. 2006. Expression of chemokines in GVHD target organs is influenced by conditioning and genetic factors and amplified by GVHR. *Biol Blood Marrow Transplant*, 12, 623-634.
- [228] Cooke, K. R., Gerbitz, A., Crawford, J. M., Teshima, T., Hill, G. R., Tesolin, A., Rossignol, D. P. and Ferrara, J. L. 2001. LPS antagonism reduces graft-versus-host disease and preserves graft-versus-leukemia activity after experimental bone marrow transplantation. *J Clin Invest*, 107, 1581-1589.
- [229] Jaksch, M. and Mattsson, J. 2005. The pathophysiology of acute graft-versus-host disease. *Scand J Immunol*, 61, 398-409.
- [230] Johansson, J. E., Brune, M. and Ekman, T. 2001. The gut mucosa barrier is preserved during allogeneic, haemopoietic stem cell transplantation with reduced intensity conditioning. *Bone Marrow Transplant*, 28, 737-742.
- [231] Nestel, F. P., Price, K. S., Seemayer, T. A. and Lapp, W. S. 1992. Macrophage priming and lipopolysaccharide-triggered release of tumor necrosis factor alpha during graft-versus-host disease. *J Exp Med*, 175, 405-413.
- [232] van Bekkum, D. W. and Knaan, S. 1977. Role of bacterial microflora in development of intestinal lesions from graft-versus-host reaction. *J Natl Cancer Inst*, 58, 787-790.
- [233] Skinhoj, P., Jacobsen, N., Hoiby, N. and Faber, V. 1987. Strict protective isolation in allogeneic bone marrow transplantation: effect on infectious complications, fever and graft versus host disease. *Scand J Infect Dis*, 19, 91-96.
- [234] van Bekkum, D. W., Roodenburg, J., Heidt, P. J. and van der Waaij, D. 1974. Mitigation of secondary disease of allogeneic mouse radiation chimeras by modification of the intestinal microflora. *J Natl Cancer Inst*, 52, 401-404.
- [235] Vossen, J. M., Heidt, P. J., van den Berg, H., Gerritsen, E. J., Hermans, J. and Dooren, L. J. 1990. Prevention of infection and graft-versus-host disease by suppression of intestinal

microflora in children treated with allogeneic bone marrow transplantation. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 9, 14-23.

[236] Beelen, D. W., Haralambie, E., Brandt, H., Linzenmeier, G., Muller, K. D., Quabeck, K., Sayer, H. G., Graeven, U., Mahmoud, H. K. and Schaefer, U. W. 1992. Evidence that sustained growth suppression of intestinal anaerobic bacteria reduces the risk of acute graft-versus-host disease after sibling marrow transplantation. *Blood*, 80, 2668-2676.

[237] Beelen, D. W., Elmaagacli, A., Muller, K. D., Hirche, H. and Schaefer, U. W. 1999. Influence of intestinal bacterial decontamination using metronidazole and ciprofloxacin or ciprofloxacin alone on the development of acute graft-versus-host disease after marrow transplantation in patients with hematologic malignancies: final results and long-term follow-up of an open-label prospective randomized trial. *Blood*, 93, 3267-3275.

[238] Wells, J. M., Loonen, L. M. and Karczewski, J. M. 2010. The role of innate signaling in the homeostasis of tolerance and immunity in the intestine. *Int J Med Microbiol*, 300, 41-48.

[239] Shlomchik, W. D., Couzens, M. S., Tang, C. B., McNiff, J., Robert, M. E., Liu, J., Shlomchik, M. J. and Emerson, S. G. 1999. Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. *Science*, 285, 412-415.

[240] Duffner, U. A., Maeda, Y., Cooke, K. R., Reddy, P., Ordemann, R., Liu, C., Ferrara, J. L. and Teshima, T. 2004. Host dendritic cells alone are sufficient to initiate acute graft-versus-host disease. *J Immunol*, 172, 7393-7398.

[241] Ogura, Y., Bonen, D. K., Inohara, N., Nicolae, D. L., Chen, F. F., Ramos, R., Britton, H., Moran, T., Karaliuskas, R., Duerr, R. H., Achkar, J. P., Brant, S. R., Bayless, T. M., Kirschner, B. S., Hanauer, S. B., Nunez, G. and Cho, J. H. 2001. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*, 411, 603-606.

[242] Hugot, J. P., Chamaillard, M., Zouali, H., Lesage, S., Cezard, J. P., Belaiche, J., Almer, S., Tysk, C., O'Morain, C. A., Gassull, M., Binder, V., Finkel, Y., Cortot, A., Modigliani, R., Laurent-Puig, P., Gower-Rousseau, C., Macry, J., Colombel, J. F., Sahbatou, M. and Thomas, G. 2001. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*, 411, 599-603.

[243] Dickinson, A. M., Middleton, P. G., Rocha, V., Gluckman, E. and Holler, E. 2004. Genetic polymorphisms predicting the outcome of bone marrow transplants. *Br J Haematol*, 127, 479-490.

[244] Elmaagacli, A. H., Koldehoff, M., Hindahl, H., Steckel, N. K., Trenchel, R., Peceny, R., Ottinger, H., Rath, P. M., Ross, R. S., Roggendorf, M., Grosse-Wilde, H. and Beelen, D. W.

2006. Mutations in innate immune system NOD2/CARD 15 and TLR-4 (Thr399Ile) genes influence the risk for severe acute graft-versus-host disease in patients who underwent an allogeneic transplantation. *Transplantation*, 81, 247-254.

[245] Holler, E., Rogler, G., Brenmoehl, J., Hahn, J., Greinix, H., Dickinson, A. M., Socie, G., Wolff, D., Finke, J., Fischer, G., Jackson, G., Rocha, V., Hilgendorf, I., Eissner, G., Marienhagen, J. and Andreesen, R. 2008. The role of genetic variants of NOD2/CARD15, a receptor of the innate immune system, in GvHD and complications following related and unrelated donor haematopoietic stem cell transplantation. *Int J Immunogenet*, 35, 381-384.

[246] van der Velden, W. J., Blijlevens, N. M., Maas, F. M., Schaap, N. P., Jansen, J. H., van der Reijden, B. A., Feuth, T., Dolstra, H. and Donnelly, J. P. 2009. NOD2 polymorphisms predict severe acute graft-versus-host and treatment-related mortality in T-cell-depleted haematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 44, 243-248.

[247] Penack, O., Smith, O. M., Cunningham-Bussel, A., Liu, X., Rao, U., Yim, N., Na, I. K., Holland, A. M., Ghosh, A., Lu, S. X., Jenq, R. R., Liu, C., Murphy, G. F., Brandl, K. and van den Brink, M. R. 2009. NOD2 regulates hematopoietic cell function during graft-versus-host disease. *J Exp Med*, 206, 2101-2110.

[248] Landfried, K., Bataille, F., Rogler, G., Brenmoehl, J., Kosovac, K., Wolff, D., Hilgendorf, I., Hahn, J., Edinger, M., Hoffmann, P., Obermeier, F., Schoelmerich, J., Andreesen, R. and Holler, E. 2010. Recipient NOD2/CARD15 status affects cellular infiltrates in human intestinal graft-versus-host disease. *Clin Exp Immunol*, 159, 87-92.

[249] Kobayashi, K. S., Chamaillard, M., Ogura, Y., Henegariu, O., Inohara, N., Nunez, G. and Flavell, R. A. 2005. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science*, 307, 731-734.

[250] Wehkamp, J., Harder, J., Weichenthal, M., Schwab, M., Schaffeler, E., Schlee, M., Herrlinger, K. R., Stallmach, A., Noack, F., Fritz, P., Schroder, J. M., Bevins, C. L., Fellermann, K. and Stange, E. F. 2004. NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. *Gut*, 53, 1658-1664.

[251] Watanabe, T., Kitani, A., Murray, P. J. and Strober, W. 2004. NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated T helper type 1 responses. *Nat Immunol*, 5, 800-808.

[252] Watanabe, T., Kitani, A., Murray, P. J., Wakatsuki, Y., Fuss, I. J. and Strober, W. 2006. Nucleotide binding oligomerization domain 2 deficiency leads to dysregulated TLR2 signaling and induction of antigen-specific colitis. *Immunity*, 25, 473-485.

- [253] Yang, Z., Fuss, I. J., Watanabe, T., Asano, N., Davey, M. P., Rosenbaum, J. T., Strober, W. and Kitani, A. 2007. NOD2 transgenic mice exhibit enhanced MDP-mediated down-regulation of TLR2 responses and resistance to colitis induction. *Gastroenterology*, 133, 1510-1521.
- [254] Hampe, J., Franke, A., Rosenstiel, P., Till, A., Teuber, M., Huse, K., Albrecht, M., Mayr, G., De La Vega, F. M., Briggs, J., Gunther, S., Prescott, N. J., Onnie, C. M., Hasler, R., Sipos, B., Folsch, U. R., Lengauer, T., Platzer, M., Mathew, C. G., Krawczak, M. and Schreiber, S. 2007. A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat Genet*, 39, 207-211.
- [255] Homer, C. R., Richmond, A. L., Rebert, N. A., Achkar, J. P. and McDonald, C. 2010. ATG16L1 and NOD2 interact in an autophagy-dependent antibacterial pathway implicated in Crohn's disease pathogenesis. *Gastroenterology*, 139, 1630-1641, 1641 e1631-1632.
- [256] Wildenberg, M. E., Vos, A. C., Wolfkamp, S. C., Duijvestein, M., Verhaar, A. P., Te Velde, A. A., van den Brink, G. R. and Hommes, D. W. 2012. Autophagy attenuates the adaptive immune response by destabilizing the immunologic synapse. *Gastroenterology*, 142, 1493-1503 e1496.
- [257] Hill, G. R., Teshima, T., Gerbitz, A., Pan, L., Cooke, K. R., Brinson, Y. S., Crawford, J. M. and Ferrara, J. L. 1999. Differential roles of IL-1 and TNF-alpha on graft-versus-host disease and graft versus leukemia. *J Clin Invest*, 104, 459-467.
- [258] Holler, E., Landfried, K., Meier, J., Hausmann, M. and Rogler, G. 2010. The role of bacteria and pattern recognition receptors in GVHD. *Int J Inflam*, 2010, 814326.
- [259] Lorenz, E., Mira, J. P., Frees, K. L. and Schwartz, D. A. 2002. Relevance of mutations in the TLR4 receptor in patients with gram-negative septic shock. *Arch Intern Med*, 162, 1028-1032.
- [260] Agnese, D. M., Calvano, J. E., Hahm, S. J., Coyle, S. M., Corbett, S. A., Calvano, S. E. and Lowry, S. F. 2002. Human toll-like receptor 4 mutations but not CD14 polymorphisms are associated with an increased risk of gram-negative infections. *J Infect Dis*, 186, 1522-1525.
- [261] Imado, T., Iwasaki, T., Kitano, S., Satake, A., Kuroiwa, T., Tsunemi, S. and Sano, H. 2010. The protective role of host Toll-like receptor-4 in acute graft-versus-host disease. *Transplantation*, 90, 1063-1070.



- [262] Vijay-Kumar, M., Sanders, C. J., Taylor, R. T., Kumar, A., Aitken, J. D., Sitaraman, S. V., Neish, A. S., Uematsu, S., Akira, S., Williams, I. R. and Gewirtz, A. T. 2007. Deletion of TLR5 results in spontaneous colitis in mice. *J Clin Invest*, 117, 3909-3921.
- [263] Vijay-Kumar, M., Wu, H., Jones, R., Grant, G., Babbin, B., King, T. P., Kelly, D., Gewirtz, A. T. and Neish, A. S. 2006. Flagellin suppresses epithelial apoptosis and limits disease during enteric infection. *Am J Pathol*, 169, 1686-1700.
- [264] Hossain, M. S., Jaye, D. L., Pollack, B. P., Farris, A. B., Tselanyane, M. L., David, E., Roback, J. D., Gewirtz, A. T. and Waller, E. K. 2011. Flagellin, a TLR5 agonist, reduces graft-versus-host disease in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation recipients while enhancing antiviral immunity. *J Immunol*, 187, 5130-5140.
- [265] Lodes, M. J., Cong, Y., Elson, C. O., Mohamath, R., Landers, C. J., Targan, S. R., Fort, M. and Hershberg, R. M. 2004. Bacterial flagellin is a dominant antigen in Crohn disease. *J Clin Invest*, 113, 1296-1306.
- [266] Gewirtz, A. T., Vijay-Kumar, M., Brant, S. R., Duerr, R. H., Nicolae, D. L. and Cho, J. H. 2006. Dominant-negative TLR5 polymorphism reduces adaptive immune response to flagellin and negatively associates with Crohn's disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 290, G1157-1163.
- [267] Jaspersion, L. K., Bucher, C., Panoskaltsis-Mortari, A., Taylor, P. A., Mellor, A. L., Munn, D. H. and Blazar, B. R. 2008. Indoleamine 2,3-dioxygenase is a critical regulator of acute graft-versus-host disease lethality. *Blood*, 111, 3257-3265.
- [268] Jaspersion, L. K., Bucher, C., Panoskaltsis-Mortari, A., Mellor, A. L., Munn, D. H. and Blazar, B. R. 2009. Inducing the tryptophan catabolic pathway, indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), for suppression of graft-versus-host disease (GVHD) lethality. *Blood*, 114, 5062-5070.
- [269] Ratajczak, P., Janin, A., Peffault de Larour, R., Koch, L., Roche, B., Munn, D., Blazar, B. R. and Socie, G. 2012. IDO in human gut graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*, 18, 150-155.
- [270] Landfried, K., Zhu, W., Waldhier, M. C., Schulz, U., Ammer, J., Holler, B., Wolff, D., Edinger, M., Peter, K., Kreutz, M., Andreesen, R., Oefner, P. J. and Holler, E. 2011. Tryptophan catabolism is associated with acute GVHD after human allogeneic stem cell transplantation and indicates activation of indoleamine 2,3-dioxygenase. *Blood*, 118, 6971-6974.

- [271] Pakkala, I., Taskinen, E., Pakkala, S. and Raisanen-Sokolowski, A. 2001. MC1288, a vitamin D analog, prevents acute graft-versus-host disease in rat bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 27, 863-867.
- [272] Kreutz, M., Eissner, G., Hahn, J., Andreesen, R., Drobnik, W. and Holler, E. 2004. Variations in 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and 25-hydroxyvitamin D3 serum levels during allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 33, 871-873.
- [273] Middleton, P. G., Cullup, H., Dickinson, A. M., Norden, J., Jackson, G. H., Taylor, P. R. and Cavet, J. 2002. Vitamin D receptor gene polymorphism associates with graft-versus-host disease and survival in HLA-matched sibling allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 30, 223-228.
- [274] Gorman, S., Kuritzky, L. A., Judge, M. A., Dixon, K. M., McGlade, J. P., Mason, R. S., Finlay-Jones, J. J. and Hart, P. H. 2007. Topically applied 1,25-dihydroxyvitamin D3 enhances the suppressive activity of CD4+CD25+ cells in the draining lymph nodes. *J Immunol*, 179, 6273-6283.
- [275] Kreutz, M., Karrer, S., Hoffmann, P., Gottfried, E., Szeimies, R. M., Hahn, J., Edinger, M., Landthaler, M., Andreesen, R., Merad, M. and Holler, E. 2012. Whole-body UVB irradiation during allogeneic hematopoietic cell transplantation is safe and decreases acute graft-versus-host disease. *J Invest Dermatol*, 132, 179-187.
- [276] Graw, R. G., Jr., Herzig, G. P., Eisel, R. J. and Perry, S. 1971. Leukocyte and platelet collection from normal donors with the continuous flow blood cell separator. *Transfusion*, 11, 94-101.
- [277] Johnson, W. D., Jr., Mei, B. and Cohn, Z. A. 1977. The separation, long-term cultivation, and maturation of the human monocyte. *J Exp Med*, 146, 1613-1626.
- [278] Sanderson, R. J., Shepperdson, R. T., Vatter, A. E. and Talmage, D. W. 1977. Isolation and enumeration of peripheral blood monocytes. *J Immunol*, 118, 1409-1414.
- [279] Freudig D. and Sauermost R. 2004. Lexikon der Biologie. CD-Rom. Spektrum Akademischer Verlag.
- [280] Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H. 1992. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *Biotechnology*, 24, 17-27.
- [281] Smits, H. H., van Beelen, A. J., Hessle, C., Westland, R., de Jong, E., Soeteman, E., Wold, A., Wierenga, E. A. and Kapsenberg, M. L. 2004. Commensal Gram-negative bacteria

prime human dendritic cells for enhanced IL-23 and IL-27 expression and enhanced Th1 development. *Eur J Immunol*, 34, 1371-1380.

[282] Tada, H., Aiba, S., Shibata, K., Ohteki, T. and Takada, H. 2005. Synergistic effect of Nod1 and Nod2 agonists with toll-like receptor agonists on human dendritic cells to generate interleukin-12 and T helper type 1 cells. *Infect Immun*, 73, 7967-7976.

[283] Uehori, J., Fukase, K., Akazawa, T., Uematsu, S., Akira, S., Funami, K., Shingai, M., Matsumoto, M., Azuma, I., Toyoshima, K., Kusumoto, S. and Seya, T. 2005. Dendritic cell maturation induced by muramyl dipeptide (MDP) derivatives: monoacylated MDP confers TLR2/TLR4 activation. *J Immunol*, 174, 11, 7096-7103.

[284] Tsuji, S., Matsumoto, M., Takeuchi, O., Akira, S., Azuma, I., Hayashi, A., Toyoshima, K. and Seya, T. 2000. Maturation of human dendritic cells by cell wall skeleton of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin: involvement of toll-like receptors. *Infect Immun*, 68, 12, 6883-6890.

[285] Nagata, S. and Golstein, P. 1995. The Fas death factor. *Science*, 267, 1449-1456.

[286] Shibaki, A. and Katz, S. I. 2001. Activation through CD40 ligation induces functional Fas ligand expression by Langerhans cells. *Eur J Immunol*, 31, 10, 3006-3015.

[287] Rescigno, M., Piguet, V., Valzasina, B., Lens, S., Zubler, R., French, L., Kindler, V., Tschopp, J. and Ricciardi-Castagnoli, P. 2000. Fas engagement induces the maturation of dendritic cells (DCs), the release of interleukin (IL)-1 $\beta$ , and the production of interferon gamma in the absence of IL-12 during DC-T cell cognate interaction: a new role for Fas ligand in inflammatory responses. *J Exp Med*, 192, 1661-1668.

[288] Ashany, D., Savir, A., Bhardwaj, N. and Elkon, K. B. 1999. Dendritic cells are resistant to apoptosis through the Fas (CD95/APO-1) pathway. *J Immunol*, 163, 10, 5303-5311.

[289] Lundqvist, A., Nagata, T., Kiessling, R. and Pisa, P. 2002. Mature dendritic cells are protected from Fas/CD95-mediated apoptosis by upregulation of Bcl-X(L). *Cancer Immunol Immunother*, 51, 3, 139-144.

[290] Chen, M., Felix, K. and Wang, J. 2012. Critical role for perforin and Fas-dependent killing of dendritic cells in the control of inflammation. *Blood*, 119, 127-136.

[291] Matsue, H., Edelbaum, D., Hartmann, A. C., Morita, A., Bergstresser, P. R., Yagita, H., Okumura, K. and Takashima, A. 1999. Dendritic cells undergo rapid apoptosis in vitro during antigen-specific interaction with CD4<sup>+</sup> T cells. *J Immunol*, 162, 9, 5287-5298.

- [292] Kuipers, H., Muskens, F., Willart, M., Hijdra, D., van Assema, F. B., Coyle, A. J., Hoogsteden, H. C. and Lambrecht, B. N. 2006. Contribution of the PD-1 ligands/PD-1 signaling pathway to dendritic cell-mediated CD4<sup>+</sup> T cell activation. *Eur J Immunol*, 36, 2472-2482.
- [293] Sumpter, T. L. and Thomson, A. W. 2011. The STATus of PD-L1 (B7-H1) on tolerogenic APCs. *Eur J Immunol*, 41, 2, 286-290.
- [294] Castellaneta, A., Sumpter, T. L., Chen, L., Tokita, D. and Thomson, A. W. 2009. NOD2 ligation subverts IFN- $\alpha$  production by liver plasmacytoid dendritic cells and inhibits their T cell allostimulatory activity via B7-H1 up-regulation. *J Immunol*, 183, 11, 6922-6932.
- [295] Jones, S. A. 2005. Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. *J Immunol*, 175, 6, 3463-3468.
- [296] Chamorro, S., Garcia-Vallejo, J. J., Unger, W. W., Fernandes, R. J., Bruijns, S. C., Laban, S., Roep, B. O., t Hart, B. A. and van Kooyk, Y. 2009. TLR triggering on tolerogenic dendritic cells results in TLR2 up-regulation and a reduced proinflammatory immune program. *J Immunol*, 183, 5, 2984-2994.
- [297] Zeilhofer, H. U. and Schorr, W. 2000. Role of interleukin-8 in neutrophil signaling. *Curr Opin Hematol*, 7, 178-182.
- [298] Garrett, S., Fitzgerald, M. C. and Sullivan, K. E. 2008. LPS and poly I:C induce chromatin modifications at a novel upstream region of the IL-23 p19 promoter. *Inflammation*, 31, 235-246.
- [299] Jang, M. S., Son, Y. M., Kim, G. R., Lee, Y. J., Lee, W. K., Cha, S. H., Han, S. H. and Yun, C. H. 2009. Synergistic production of interleukin-23 by dendritic cells derived from cord blood in response to costimulation with LPS and IL-12. *J Leukoc Biol*, 86, 691-699.
- [300] Jung, I. D., Lee, M. G., Chang, J. H., Lee, J. S., Jeong, Y. I., Lee, C. M., Park, W. S., Han, J., Seo, S. K., Lee, S. Y. and Park, Y. M. 2009. Blockade of indoleamine 2,3-dioxygenase protects mice against lipopolysaccharide-induced endotoxin shock. *J Immunol*, 182, 3146-3154.
- [301] Thoma-Uszynski, S., Kiertscher, S. M., Ochoa, M. T., Bouis, D. A., Norgard, M. V., Miyake, K., Godowski, P. J., Roth, M. D. and Modlin, R. L. 2000. Activation of toll-like receptor 2 on human dendritic cells triggers induction of IL-12, but not IL-10. *J Immunol*, 165, 7, 3804-3810.

- [302] Fournier, B., Williams, I. R., Gewirtz, A. T. and Neish, A. S. 2009. Toll-like receptor 5-dependent regulation of inflammation in systemic *Salmonella enterica* Serovar typhimurium infection. *Infect Immun*, 77, 9, 4121-4129.
- [303] Watanabe, T., Asano, N., Murray, P. J., Ozato, K., Tailor, P., Fuss, I. J., Kitani, A. and Strober, W. 2008. Muramyl dipeptide activation of nucleotide-binding oligomerization domain 2 protects mice from experimental colitis. *J Clin Invest*, 118, 545-559.
- [304] Mäkelä, S. M., Strengell, M., Pietila, T. E., Osterlund, P. and Julkunen, I. 2009. Multiple signaling pathways contribute to synergistic TLR ligand-dependent cytokine gene expression in human monocyte-derived macrophages and dendritic cells. *J Leukoc Biol*, 85, 4, 664-672.
- [305] Kinnebrew, M. A., Buffie, C. G., Diehl, G. E., Zenewicz, L. A., Leiner, I., Hohl, T. M., Flavell, R. A., Littman, D. R. and Pamer, E. G. 2012. Interleukin 23 production by intestinal CD103(+)CD11b(+) dendritic cells in response to bacterial flagellin enhances mucosal innate immune defense. *Immunity*, 36, 2, 276-287.
- [306] Vicente-Suarez, I., Takahashi, Y., Cheng, F., Horna, P., Wang, H. W., Wang, H. G. and Sotomayor, E. M. 2007. Identification of a novel negative role of flagellin in regulating IL-10 production. *Eur J Immunol*, 37, 3164-3175.
- [307] Vicente-Suarez, I., Brayer, J., Villagra, A., Cheng, F. and Sotomayor, E. M. 2009. TLR5 ligation by flagellin converts tolerogenic dendritic cells into activating antigen-presenting cells that preferentially induce T-helper 1 responses. *Immunol Lett*, 125, 114-118.
- [308] Traub, S., Kubasch, N., Morath, S., Kresse, M., Hartung, T., Schmidt, R. R. and Hermann, C. 2004. Structural requirements of synthetic muropeptides to synergize with lipopolysaccharide in cytokine induction. *J Biol Chem*, 279, 8694-8700.
- [309] Magalhaes, J. G., Fritz, J. H., Le Bourhis, L., Sellge, G., Travassos, L. H., Selvanantham, T., Girardin, S. E., Gommerman, J. L. and Philpott, D. J. 2008. Nod2-dependent Th2 polarization of antigen-specific immunity. *J Immunol*, 181, 7925-7935.
- [310] van Heel, D. A., Ghosh, S., Butler, M., Hunt, K. A., Lundberg, A. M., Ahmad, T., McGovern, D. P., Onnie, C., Negoro, K., Goldthorpe, S., Foxwell, B. M., Mathew, C. G., Forbes, A., Jewell, D. P. and Playford, R. J. 2005. Muramyl dipeptide and toll-like receptor sensitivity in NOD2-associated Crohn's disease. *Lancet*, 365, 9473, 1794-1796.
- [311] Todate, A., Suda, T., Kuwata, H., Chida, K. and Nakamura, H. 2001. Muramyl dipeptide-Lys stimulates the function of human dendritic cells. *J Leukoc Biol*, 70, 5, 723-729.

- [312] Fujimura, T., Yamasaki, K., Hidaka, T., Ito, Y. and Aiba, S. 2011. A synthetic NOD2 agonist, muramyl dipeptide (MDP)-Lys (L18) and IFN-beta synergistically induce dendritic cell maturation with augmented IL-12 production and suppress melanoma growth. *J Dermatol Sci*, 62, 2, 107-115.
- [313] Tsubura, E., Azuma, I. and Une, T. 1988. Muroctasin, a muramyl dipeptide derivative. An introductory overview. *Arzneimittelforschung*, 38, 7A, 951-952.
- [314] Moroi, R., Yamazaki, K., Hirota, T., Watanabe, S., Oki, M., Toriyama, M., Ichinohe, A. and Kataoka, K. 1988. Studies on the stability of muroctasin and degradation products built under extreme conditions. *Arzneimittelforschung*, 38, 7A, 959-968.
- [315] Wolfert, M. A., Murray, T. F., Boons, G. J. and Moore, J. N. 2002. The origin of the synergistic effect of muramyl dipeptide with endotoxin and peptidoglycan. *J Biol Chem*, 277, 39179-39186.
- [316] Negishi, H., Ohba, Y., Yanai, H., Takaoka, A., Honma, K., Yui, K., Matsuyama, T., Taniguchi, T. and Honda, K. 2005. Negative regulation of Toll-like-receptor signaling by IRF-4. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 15989-15994.
- [317] Honma, K., Udon, H., Kohno, T., Yamamoto, K., Ogawa, A., Takemori, T., Kumatori, A., Suzuki, S., Matsuyama, T. and Yui, K. 2005. Interferon regulatory factor 4 negatively regulates the production of proinflammatory cytokines by macrophages in response to LPS. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 16001-16006.
- [318] Begue, B., Dumant, C., Bambou, J. C., Beaulieu, J. F., Chamaillard, M., Hugot, J. P., Goulet, O., Schmitz, J., Philpott, D. J., Cerf-Bensussan, N. and Ruemmele, F. M. 2006. Microbial induction of CARD15 expression in intestinal epithelial cells via toll-like receptor 5 triggers an antibacterial response loop. *J Cell Physiol*, 209, 2, 241-252.
- [319] Rosenstiel, P., Fantini, M., Brautigam, K., Kuhbacher, T., Waetzig, G. H., Seeger, D. and Schreiber, S. 2003. TNF-alpha and IFN-gamma regulate the expression of the NOD2 (CARD15) gene in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology*, 124, 1001-1009.
- [320] Takeda, K. and Akira, S. 2001. Roles of Toll-like receptors in innate immune responses. *Genes Cells*, 6, 733-742.
- [321] Kobayashi, K., Hernandez, L. D., Galan, J. E., Janeway, C. A., Jr., Medzhitov, R. and Flavell, R. A. 2002. IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell*, 110, 191-202.

- [322] Wiken, M., Grunewald, J., Eklund, A. and Wahlstrom, J. 2009. Higher monocyte expression of TLR2 and TLR4, and enhanced pro-inflammatory synergy of TLR2 with NOD2 stimulation in sarcoidosis. *J Clin Immunol*, 29, 1, 78-89.
- [323] Eckmann, L. 2004. Innate immunity and mucosal bacterial interactions in the intestine. *Curr Opin Gastroenterol*, 20, 82-88.
- [324] Abreu, M. T., Fukata, M. and Arditi, M. 2005. TLR signaling in the gut in health and disease. *J Immunol*, 174, 4453-4460.
- [325] Kwon, S., Gewirtz, A. T., Hurley, D. J., Robertson, T. P., Moore, J. N. and Vandenplas, M. L. 2011. Disparities in TLR5 expression and responsiveness to flagellin in equine neutrophils and mononuclear phagocytes. *J Immunol*, 186, 11, 6263-6270.
- [326] Naito, Y., Takagi, T., Mizushima, K., Ueta, M., Kinoshita, S., Handa, O., Kokura, S., Ichikawa, H., Yoshida, N. and Yoshikawa, T. 2006. Gene expression clusters of a lipopolysaccharide-stimulated pathway in peripheral blood monocytes of Japanese patients with Crohn's disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics Symposium Series*, 2, 1, 256-265.
- [327] Ganz, M., Csak, T., Nath, B. and Szabo, G. 2011. Lipopolysaccharide induces and activates the Nalp3 inflammasome in the liver. *World J Gastroenterol*, 17, 4772-4778.
- [328] Xu, Y., Jagannath, C., Liu, X. D., Sharafkhaneh, A., Kolodziejaska, K. E. and Eissa, N. T. 2007. Toll-like receptor 4 is a sensor for autophagy associated with innate immunity. *Immunity*, 27, 1, 135-144.
- [329] Saitoh, T., Fujita, N., Jang, M. H., Uematsu, S., Yang, B. G., Satoh, T., Omori, H., Noda, T., Yamamoto, N., Komatsu, M., Tanaka, K., Kawai, T., Tsujimura, T., Takeuchi, O., Yoshimori, T. and Akira, S. 2008. Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1 $\beta$  production. *Nature*, 456, 264-268.
- [330] Popov, A. and Schultze, J. L. 2008. IDO-expressing regulatory dendritic cells in cancer and chronic infection. *J Mol Med (Berl)*, 86, 2, 145-160.
- [331] Mahanonda, R., Sa-Ard-lam, N., Montreekachon, P., Pimkhaokham, A., Yongvanichit, K., Fukuda, M. M. and Pichyangkul, S. 2007. IL-8 and IDO expression by human gingival fibroblasts via TLRs. *J Immunol*, 178, 2, 1151-1157.
- [332] Kimura, A., Naka, T., Nohara, K., Fujii-Kuriyama, Y. and Kishimoto, T. 2008. Aryl hydrocarbon receptor regulates Stat1 activation and participates in the development of Th17 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 9721-9726.

- [333] Ploder, M., Spittler, A., Schroecksadel, K., Neurauter, G., Pelinka, L. E., Roth, E. and Fuchs, D. 2009. Tryptophan degradation in multiple trauma patients: survivors compared with non-survivors. *Clin Sci (Lond)*, 116, 593-598.
- [334] Huttunen, R., Syrjanen, J., Aittoniemi, J., Oja, S. S., Raitala, A., Laine, J., Pertovaara, M., Vuento, R., Huhtala, H. and Hurme, M. 2010. High activity of indoleamine 2,3 dioxygenase enzyme predicts disease severity and case fatality in bacteremic patients. *Shock*, 33, 149-154.
- [335] Pellegrin, K., Neurauter, G., Wirleitner, B., Fleming, A. W., Peterson, V. M. and Fuchs, D. 2005. Enhanced enzymatic degradation of tryptophan by indoleamine 2,3-dioxygenase contributes to the tryptophan-deficient state seen after major trauma. *Shock*, 23, 3, 209-215.
- [336] Jeffery, L. E., Wood, A. M., Qureshi, O. S., Hou, T. Z., Gardner, D., Briggs, Z., Kaur, S., Raza, K. and Sansom, D. M. 2012. Availability of 25-hydroxyvitamin D(3) to APCs controls the balance between regulatory and inflammatory T cell responses. *J Immunol*, 189, 11, 5155-5164.
- [337] Wang, T. T., Dabbas, B., Laperriere, D., Bitton, A. J., Soualhine, H., Tavera-Mendoza, L. E., Dionne, S., Servant, M. J., Bitton, A., Seidman, E. G., Mader, S., Behr, M. A. and White, J. H. 2010. Direct and indirect induction by 1,25-dihydroxyvitamin D3 of the NOD2/CARD15-defensin beta2 innate immune pathway defective in Crohn disease. *J Biol Chem*, 285, 4, 2227-2231.
- [338] Martinelli, E., Tharinger, H., Frank, I., Arthos, J., Piatak, M., Jr., Lifson, J. D., Blanchard, J., Gettie, A. and Robbiani, M. 2011. HSV-2 infection of dendritic cells amplifies a highly susceptible HIV-1 cell target. *PLoS Pathog*, 7, 6, e1002109.
- [339] Manicassamy, S., Ravindran, R., Deng, J., Oluoch, H., Denning, T. L., Kasturi, S. P., Rosenthal, K. M., Evavold, B. D. and Pulendran, B. 2009. Toll-like receptor 2-dependent induction of vitamin A-metabolizing enzymes in dendritic cells promotes T regulatory responses and inhibits autoimmunity. *Nat Med*, 15, 4, 401-409.
- [340] Yokota, A., Takeuchi, H., Maeda, N., Ohoka, Y., Kato, C., Song, S. Y. and Iwata, M. 2009. GM-CSF and IL-4 synergistically trigger dendritic cells to acquire retinoic acid-producing capacity. *Int Immunol*, 21, 361-377.
- [341] Uematsu, S., Fujimoto, K., Jang, M. H., Yang, B. G., Jung, Y. J., Nishiyama, M., Sato, S., Tsujimura, T., Yamamoto, M., Yokota, Y., Kiyono, H., Miyasaka, M., Ishii, K. J. and Akira, S. 2008. Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5. *Nat Immunol*, 9, 769-776.



- [342] Feng, T., Cong, Y., Qin, H., Benveniste, E. N. and Elson, C. O. 2010. Generation of mucosal dendritic cells from bone marrow reveals a critical role of retinoic acid. *J Immunol*, 185, 10, 5915-5925.
- [343] Chandran, S. S., Verhoeven, D., Teijaro, J. R., Fenton, M. J. and Farber, D. L. 2009. TLR2 engagement on dendritic cells promotes high frequency effector and memory CD4 T cell responses. *J Immunol*, 183, 12, 7832-7841.
- [344] Stern, J. B. and Smith, K. A. 1986. Interleukin-2 induction of T-cell G1 progression and c-myc expression. *Science*, 233, 4760, 203-206.
- [345] Beadling, C., Johnson, K. W. and Smith, K. A. 1993. Isolation of interleukin 2-induced immediate-early genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 7, 2719-2723.
- [346] Smith, K. A. 1988. Interleukin-2: inception, impact, and implications. *Science*, 240, 4856, 1169-1176.
- [347] Gasteiger, G. and Kastenmuller, W. 2012. Foxp3+ Regulatory T-cells and IL-2: The Moirai of T-cell Fates? *Front Immunol*, 3, 179.
- [348] Agrawal, S., Agrawal, A., Doughty, B., Gerwitz, A., Blenis, J., Van Dyke, T. and Pulendran, B. 2003. Cutting edge: different Toll-like receptor agonists instruct dendritic cells to induce distinct Th responses via differential modulation of extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase and c-Fos. *J Immunol*, 171, 10, 4984-4989.
- [349] Didierlaurent, A., Ferrero, I., Otten, L. A., Dubois, B., Reinhardt, M., Carlsen, H., Blomhoff, R., Akira, S., Kraehenbuhl, J. P. and Sirard, J. C. 2004. Flagellin promotes myeloid differentiation factor 88-dependent development of Th2-type response. *J Immunol*, 172, 11, 6922-6930.
- [350] Diehl, S. and Rincon, M. 2002. The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. *Mol Immunol*, 39, 9, 531-536
- [351] Krishnamoorthy, N., Oriss, T., Pagila, M., Ray, A. and Ray, P. 2007. A critical role for IL-6 secretion by dendritic cells promoting Th2 and limiting Th1 response. *The Journal of Immunology*, 178, 95, 181
- [352] Jin, B., Sun, T., Yu, X. H., Yang, Y. X. and Yeo, A. E. 2012. The effects of TLR activation on T-cell development and differentiation. *Clin Dev Immunol*, 2012, 836485
- [353] Crellin, N. K., Garcia, R. V., Hadisfar, O., Allan, S. E., Steiner, T. S. and Levings, M. K. 2005. Human CD4+ T cells express TLR5 and its ligand flagellin enhances the suppressive

capacity and expression of FOXP3 in CD4+CD25+ T regulatory cells. *J Immunol*, 175, 12, 8051-8059

[354] Lewkowicz, P., Lewkowicz, N., Sasiak, A. and Tchorzewski, H. 2006. Lipopolysaccharide-activated CD4+CD25+ T regulatory cells inhibit neutrophil function and promote their apoptosis and death. *J Immunol*, 177, 10, 7155-7163

[355] Liu, G., Zhang, L. and Zhao, Y. 2010. Modulation of immune responses through direct activation of Toll-like receptors to T cells. *Clin Exp Immunol*, 160, 2, 168-175

[356] Rahman, M. K., Midtling, E. H., Svingen, P. A., Xiong, Y., Bell, M. P., Tung, J., Smyrk, T., Egan, L. J. and Faubion, W. A., Jr. 2010. The pathogen recognition receptor NOD2 regulates human FOXP3+ T cell survival. *J Immunol*, 184, 12, 7247-7256

[357] Gambhir, V., Kim, J., Siddiqui, S., Taylor, M., Byford, V., Petrof, E. O., Jones, G. and Basta, S. 2011. Influence of 1,25-dihydroxy vitamin D3 on TLR4-induced activation of antigen presenting cells is dependent on the order of receptor engagement. *Immunobiology*, 216, 988-996.

[358] Ferreira, G. B., van Etten, E., Verstuyf, A., Waer, M., Overbergh, L., Gysemans, C. and Mathieu, C. 2011. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 alters murine dendritic cell behaviour in vitro and in vivo. *Diabetes Metab Res Rev*, 27, 8, 933-941.

[359] Sivula, J., Cordova, Z. M., Tuimala, J., Jaatinen, T., Partanen, J., Volin, L. and Turpeinen, H. 2012. Toll-like receptor gene polymorphisms confer susceptibility to graft-versus-host disease in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Scand J Immunol*, 76, 3, 336-341.

[360] Zhao, Y., Liu, Q., Yang, L., He, D., Wang, L., Tian, J., Li, Y., Zi, F., Bao, H., Yang, Y., Zheng, Y., Shi, J., Xue, X. and Cai, Z. 2013. TLR4 inactivation protects from graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Cell Mol Immunol*, 10, 2, 165-175.

[361] Gong, X. D., Ma, L. M., Zhu, L., Guo, H. M., Ren, L. S., Ren, R. R., Zhang, H. P., Wei, F. and Niu, Y. Y. 2012. Prophylactic effect of TLR5 agonist flagellin on acute graft versus host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation and its mechanism. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*, 20, 4, 965-970.

[362] Joseph, R. W., Bayraktar, U. D., Kim, T. K., St John, L. S., Popat, U., Khalili, J., Molldrem, J. J., Wieder, E. D. and Komanduri, K. V. 2012. Vitamin D receptor upregulation in alloreactive human T cells. *Hum Immunol*, 73, 7, 693-698.

- [363] Benrashid, M., Moyers, K., Mohty, M. and Savani, B. N. 2012. Vitamin D deficiency, autoimmunity, and graft-versus-host-disease risk: Implication for preventive therapy. *Exp Hematol*, 40, 4, 263-267.
- [364] Koenecke, C., Prinz, I., Bubke, A., Schreder, A., Lee, C. W., Pabst, O. and Forster, R. 2012. Shift of graft-versus-host-disease target organ tropism by dietary vitamin A. *PLoS One*, 7, 5, e38252.
- [365] Auffermann-Gretzinger, S., Lossos, I. S., Vayntrub, T. A., Leong, W., Grumet, F. C., Blume, K. G., Stockerl-Goldstein, K. E., Levy, R. and Shizuru, J. A. 2002. Rapid establishment of dendritic cell chimerism in allogeneic hematopoietic cell transplant recipients. *Blood*, 99, 1442-1448.
- [366] MacDonald, K. P., Rowe, V., Clouston, A. D., Welply, J. K., Kuns, R. D., Ferrara, J. L., Thomas, R. and Hill, G. R. 2005. Cytokine expanded myeloid precursors function as regulatory antigen-presenting cells and promote tolerance through IL-10-producing regulatory T cells. *J Immunol*, 174, 1841-1850.
- [367] Koyama, M., Hashimoto, D., Aoyama, K., Matsuoka, K., Karube, K., Niino, H., Harada, M., Tanimoto, M., Akashi, K. and Teshima, T. 2009. Plasmacytoid dendritic cells prime alloreactive T cells to mediate graft-versus-host disease as antigen-presenting cells. *Blood*, 113, 2088-2095.
- [368] Kim, T. D., Terwey, T. H., Zakrzewski, J. L., Suh, D., Kochman, A. A., Chen, M. E., King, C. G., Borsotti, C., Grubin, J., Smith, O. M., Heller, G., Liu, C., Murphy, G. F., Alpdogan, O. and van den Brink, M. R. 2008. Organ-derived dendritic cells have differential effects on alloreactive T cells. *Blood*, 111, 2929-2940.
- [369] Koyama, M., Kuns, R. D., Olver, S. D., Raffelt, N. C., Wilson, Y. A., Don, A. L., Lineburg, K. E., Cheong, M., Robb, R. J., Markey, K. A., Varelias, A., Malissen, B., Hammerling, G. J., Clouston, A. D., Engwerda, C. R., Bhat, P., MacDonald, K. P. and Hill, G. R. 2011. Recipient nonhematopoietic antigen-presenting cells are sufficient to induce lethal acute graft-versus-host disease. *Nat Med*, 18, 135-142.
- [370] Li, H., Demetris, A. J., McNiff, J., Matte-Martone, C., Tan, H. S., Rothstein, D. M., Lakkis, F. G. and Shlomchik, W. D. 2012. Profound depletion of host conventional dendritic cells, plasmacytoid dendritic cells, and B cells does not prevent graft-versus-host disease induction. *J Immunol*, 188, 3804-3811.
- [371] Li, H., Matte-Martone, C., Tan, H. S., Venkatesan, S., McNiff, J., Demetris, A. J., Jain, D., Lakkis, F., Rothstein, D. and Shlomchik, W. D. 2011. Graft-versus-host disease is

independent of innate signaling pathways triggered by pathogens in host hematopoietic cells.  
*J Immunol*, 186, 230-241.

## 9 Danksagung

Besonders möchte ich mich bei Frau **Prof. Dr. Marina Kreutz** für die fürsorgliche, herzliche und vor allem hervorragende fachliche Betreuung dieser Arbeit bedanken. Die Betreuung umfasste nicht nur hilfreiche Ratschläge und Verbesserungsvorschläge auf meine sämtlichen Fragen und Anliegen, sondern vor allem Verständnis und eine Menge Geduld während der Entstehung dieser Arbeit.

Des Weiteren geht ein besonderer Dank an Herrn **Prof. Dr. Reinhard Andreesen** und Herrn **Prof. Dr. Ernst Holler**, die mir die Forschungsarbeit ermöglicht und mich unterstützt haben.

**PD Dr. Markus Pihusch** danke ich für das Engagement bei der Vermittlung der Betreuung meiner Dissertation, wodurch ich Teil der Arbeitsgruppe Holler/Kreutz werden durfte.

Vielen Dank auch an Frau **Prof. Dr. Sigrid Karrer** für die Bereitschaft, die Begutachtung dieser Arbeit von Seiten der Abteilung für Dermatologie zu übernehmen.

Der AG Hoffmann/Edinger, insbesondere **Rüdiger Eder** danke ich für die Durchführung der intrazellulären FACS-Messungen am LSR.

Ein riesengroßes „Danke“ an die AGs Kreutz und Rehli: **Alice**, vielen vielen Dank für Deine fürsorgliche Unterstützung, Deine hilfreichen Ratschläge und Tricks beim Arbeiten im Labor, Dein Engagement bei der Durchführung der MLRs und ELISAs und Deine Geduld mit mir. Ohne Dich, wäre ich bestimmt heute noch nicht mit all meinen Versuchen fertig. Bei Dir **Kas-te**, möchte ich mich vor allem für die etlichen Erklärungen und geduldigen Antworten auf meine noch so unverständlichen Fragen zu DNA, RNA und PCRs sowie das Designen der Primer für meine Realplex-Versuche bedanken. Ein besonderer Dank geht auch an Dich **Katrin**, dass Du Dich bereit erklärt hast, meine Arbeit so ausführlich Korrektur zu lesen und nicht müde geworden bist, mir mit hervorragenden Verbesserungsvorschlägen beim Korrigieren der Arbeit weiterzuhelfen. Vielen Dank auch für die Motivation und den Zuspruch deinerseits, den Du mir immer wieder gegeben hast, wenn ich mal wieder nicht weiter wusste.

**Julia und Sandra S.**, Euch danke ich für die Beantwortung meiner vielen Fragen während meiner Realplex-Versuche und vor allem bei der Hilfe und Geduld bei der Erstellung meiner Grafiken in Corel Draw. Auch Dir **Ute** danke ich, dass Du mich bei der Herausarbeitung der geeigneten Standards für die Realplex-Versuche unterstützt hast und immer ein offenes Ohr für mich hattest. **Maja**, vielen Dank für die Hilfe bei der Durchführung der RNA-Gele und **Gabi**, herzlichen Dank für Deine Geduld und die Beantwortung der vielen Laborfragen, die mir immer sehr weitergeholfen haben. An alle bereits erwähnten sowie an **Michael, Eva, Claudia, Sandra, Monika, Ireen, Dagmar, Chris, Lucia, Sabine, Thomas, Hang, Martina, Isabel, Bernadette, Astrid, Katrin S., Marta und Andrea**: Danke für die hilfreichen Ratschläge und Tipps, die einem das Laborleben als Medizinstudent unheimlich erleichtern kön-

nen, für das tolle Arbeitsklima, Eure Hilfsbereitschaft, die gute Zusammenarbeit, die erholsamen und netten Tee- und Mittagspausen, sowie die lustigen Mädelsabende und die vielen Geburtstagsfeiern. Vielen Dank, dass Ihr mich so nett aufgenommen habt und mir das Gefühl gegeben habt, Teil des Teams zu sein.

Vielen Dank an meinen tollen Kumpel **Christian**, der sich erbarmt hat, meine Arbeit Korrektur zu lesen. Du bist ein Schatz.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei **meinen Schwiegereltern** in spe bedanken, dass Sie immer ein offenes Ohr und sehr gute Ratschläge für mich übrig hatten, auch wenn ich noch so verzweifelt war. Danke für Eure Unterstützung.

Von Herzen danke ich **meinen Eltern**, die mir dieses Studium und somit auch die Entstehung dieser Arbeit ermöglicht haben und mich in jeglicher Hinsicht unterstützt und ermutigt haben. Vielen Dank, dass Ihr mir immer das Gefühl gebt, dass Ihr stolz auf mich seid und ich etwas ganz Besonderes für Euch bin. Aus diesem Grund ist diese Arbeit Euch gewidmet.

**Tobi**, vielen vielen DANK für Dein Verständnis, Deine Unterstützung, Deine übermäßige Geduld, Deine Bereitschaft, immer hinter mir zu stehen und dass es Dich in meinem Leben gibt.

## 10 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

.....  
(Ort, Datum)

.....  
(Julia Charlotte Resch)